

Université de Montréal

**Interaction entre la RNase HI et la RNase E dans le
métabolisme des R-loops et la dégradation des ARNms
chez *Escherichia coli***

par

Harmony Jill EGBE BESSONG

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Fevrier, 2014

© Harmony Jill EGBE B., 2014

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Intéraction entre la RNase HI et la RNase E dans le métabolisme des R-loops et la
dégradation des ARNms chez *Escherichia coli*

Présenté par :
Harmony Jill EGBE BESSONG

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

George Szatmari, président-rapporteur
Marc Drolet, directeur de recherche
France Daigle, membre du jury

Résumé

Chez la bactérie *Escherichia coli*, la topoisomérase I et la gyrase représentent deux topoisomérases majeures qui participent à la régulation du surenroulement de l'ADN. Celles-ci sont codées respectivement par les gènes *topA* et par *gyrA* et *gyrB*. Chez les mutants *topA*, l'excès de surenroulement négatif qui est généré en amont de la polymérase ARN lors de la phase d'élongation de la transcription de l'ADN, entraîne la formation de R-loops. Les R-loops sont des hybrides ARN-ADN qui *in vivo* sont formés lorsque l'ARN nouvellement transcrit forme un hybride avec le brin d'ADN matrice, le brin d'ADN complémentaire demeurant sous forme simple brin. La RNase HI est une endoribonucléase codée par le gène *rnhA*. Elle dégrade l'ARN de R-loops, entre autres, pour empêcher l'initiation de la réplication à des sites autres que l'origine normale, *oriC*. Chez les mutants *rnhA*, on observe une réplication indépendante de l'origine *oriC*. Ce type de réplication appelé cSDR, pourrait donc expliquer, du moins en partie, l'inhibition de la croissance de doubles mutants *topA rnhA*. A l'aide de la mutagenèse au transposon Tn5, il a été possible d'isoler des supprimeurs extragéniques qui permettaient la croissance des doubles mutants *topA rnhA*. Plusieurs de ces supprimeurs ont le transposon inséré dans le gène codant pour la RNase E, l'endoribonucléase principale impliquée dans la dégradation des ARNms chez *E. coli*. La majorité des insertions se retrouvent dans la partie C-terminale de la protéine qui est impliquée dans l'assemblage d'un complexe multiprotéique appelé l'ARN dégradosome. Les résultats obtenus démontrent que ces supprimeurs diminuent le cSDR ainsi que la réponse SOS induite constitutivement en l'absence de la RNase HI. Sachant que la RNase HI est une endoribonucléase tout comme la RNase E, une collaboration entre les deux enzymes suggère que la RNase E pourrait également jouer un rôle potentiel dans le contrôle de la formation des R-loops et bien évidemment de leur retrait au sein de la cellule. À l'opposé, il est possible que la RNase HI puisse avoir comme autre fonction la prise en charge de la maturation et de la dégradation des molécules d'ARNs.

Mots-clés : *Escherichia coli*, topoisomérases, surenroulement, R-loops,

RNase HI, cSDR, supresseurs extragéniques, maturation ARNms, RNA dégradosome, réponse SOS, RNase E

Abstract

In *Escherichia coli*, DNA topoisomerase I and DNA gyrase are the two main topoisomerases responsible for the regulation of DNA supercoiling. DNA topoisomerase I is encoded by *topA* while gyrase is encoded by *gyrA* and *gyrB*. In *topA* mutants, the accumulation of negative supercoiling behind the elongating RNA polymerase complex leads to the formation of R-loops. *In vivo*, R-loops are formed when the nascent RNA re-hybridizes with the template strand leaving the non-template strand single-stranded. RNase HI is an endoribonuclease encoded by *rnhA* and it is responsible for degrading the RNA in an R-loop, to make sure that replication is initiated only at *oriC*. Indeed, in *rnhA* mutants, *oriC*-independent replication also takes place. This type of replication, named cSDR for constitutive stable DNA replication, could explain, at least in part, the growth inhibition of double *topA rnhA* mutants. With the aid of the Tn5 transposon mutagenesis system, we were able to isolate extragenic suppressors that allowed double *topA rnhA* mutants to grow. In several of these suppressors, the transposon was inserted in the gene coding for RNase E, the major endoribonuclease responsible for mRNA degradation in *E. coli*. The majority of these insertions were located in the C-terminal half of the protein that is responsible for the assembly of the multiprotein complex called the degradosome. Our results show that the suppressors act by reducing cSDR as well as the SOS response which is constitutively expressed in the absence of *rnhA*. Since RNase HI is an endoribonuclease just like RNase E, collaboration between the two enzymes will imply that RNase E could also play a major role in the elimination of R-loops as well as their exclusion from the cell. Equally as well, RNase HI can also play a major role in the maturation and degradation of mRNAs.

Keywords : *Escherichia coli*, topoisomerases, supercoiling, R-loops, RNase HI, cSDR, extragenic suppressors, mRNA maturation, degradosome, SOS response, RNase E

Liste des tableaux

Section 1. Revue de littérature 1

Tableau 1 Comparaison des systèmes de réplifications chez <i>E. coli</i>	15
---	----

Section 2. Matériels et Méthodes 39

Tableau 2 Souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées dans cette étude.....	39
---	----

Section 3. Résultats..... 50

Tableau 3 Valeurs d' <i>Efficiency of plating</i> après 36 heures d'incubation sur un milieu riche LB.....	62
---	----

Tableau 4 Ratios <i>oriC/Ter</i> en milieu LB et M9 (tryptophane) à 37°C	76
---	----

Section 4. Annexe

Tableau 5 Valeurs d'activité de dosage de la β -galactosidase (évaluer le niveau de dégradation de l'ARN messager T7- <i>lacZ</i>)	xxxi
--	------

Tableau 6 Valeurs d'activité de dosage de la β -galactosidase (mesure de l'induction de la réponse SOS)	xxxi
--	------

Liste des figures

Section 1. Revue de littérature

Figure 1	Les tensions au sein de l'ADN: relaxé vs surenroulé	2
Figure 2	Le surenroulement de l'ADN : négatif vs positif	3
Figure 3	Action des deux types de topoisomérases	5
Figure 4	Fonctions de la topoisomérase I et de la gyrase durant la transcription	6
Figure 5	Fonctions des topoisomérases de type II durant la réplication de l'ADN	7
Figure 6	Modèle ' Twin supercoiled domain '	10
Figure 7	Suppression de R-loops par la RNase HI	12
Figure 8	Localisation des sites <i>OriKs</i> et <i>OriMs</i> chez <i>Escherichia coli</i>	15
Figure 9	Modèle de formation d'un R-loop	22
Figure 10	Régulation du niveau de surenroulement de l'ADN	24
Figure 11	Organisation et structure moléculaire de la RNase E	28
Figure 12	Voies de clivage utilisées par la RNase E.....	31
Figure 13	Organisation du dégradosome ARN chez <i>E. coli</i>	37

Section 3. Résultats

Figure 14	Effet de la RNase HI sur le niveau de surenroulement de l'ADN- I	52
Figure 15	Effet de la RNase HI sur le niveau de surenroulement de l'ADN- II.....	54
Figure 16	Structure primaire de la RNase E et suppresseurs extragéniques	56

Figure 17 Schéma détaillé de la souche ENS134.....	57
Figure 18 Dosage d'activité de la β -galactosidase pour évaluer le niveau de dégradation de l'ARN messager T7- <i>lacZ</i>	59
Figure 19 Stries quantitatives des souches MD48 (MC4100 <i>dnaA46</i> (Ts) <i>tna::Tn10</i>) et JE1 (MD48, <i>rnhA::cam</i>) sur milieu M9	64
Figure 20 Stries quantitatives des souches JE6 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 867)) et JE1 sur milieu M9	64
Figure 21 Stries quantitatives des souches JE16 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 997)) et JE1 sur milieu M9	65
Figure 22 Stries quantitatives des souches JE36 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 883))et JE1 sur milieu M9	65
Figure 23 Stries quantitatives des souches JE63 (MD 48 <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 500)) et JE1 sur milieu M9	66
Figure 24 Mesure de l'induction de la réponse SOS en déterminant le niveau d'expression du gène <i>sfiA</i> fusionné à <i>lacZ</i>	68
Figure 25 Cytométrie en flux des souches VU90 et VU92 en milieu M9	71
Figure 26 Cytométrie en flux des souches VU90, JE130, JE131 et JE54 en milieu M9 ..	72
Figure 27 Cytométrie en flux des souches VU90 et JE58 en milieu M9	73
Figure 28 Expérience de « Southern Blotting » pour déterminer le ratio OriC/Ter.....	75

Liste des abréviations

α : alpha

β : beta

σ : sigma

Δ : delta

3' et 5' : 3 prime et 5 prime

° C: degré Celsius

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple-brin

ADNdb : ADN double-brin

ADP : adénosine diphosphate

amp^R : ampicilline résistant

AR1 : *arginine-rich region 1*

AR2 : *arginine-rich region 2*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : *ARN méssager*

ARNr : *ARN ribosomal*

ARNt : *ARN de transfert*

ATP : adénosine triphosphate

C : cytosine

cSDR : « *constitutive stable DNA replication* »

C-terminale : Carboxy-terminale

CTH : *carboxyl terminal half*

E. coli : *Escherichia coli*

EBS : *enolase binding site*

e.g. : *exempli gratia* (à l'exemple de)

HBS : *helicase binding site*

iSDR : « *inducible stable DNA replication* »

IPTG : isoprobyl β -D-1-thiogalactopyranoside

G : guanine

kDa : kiloDalton (s)

LB : Luria-Bertani

MTS : *membrane targeting sequence*

nSDR : « *nutritional shift-up activated stable DNA replication* »

O/N : over-night

pb : paire de base

PNPase : polynucléotide phosphorylase

PBS : *PNPase binding site*

RppH : RNA pyrophosphohydrolase

T : thymine

tet^R : tétracycline résistant

Topo (s) : topoisomérase (s)

Ts : thermo-sensible

U : uracile

μ g : microgramme(s)

Table des matières

Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	ix
Table des matières.....	xi
Remerciements	xvi
1. Revue de littérature	1
1.1 La structure de l'ADN.....	1
1.2 Le surenroulement de l'ADN	2
1.2.1 Les Topoisomérases.....	5
1.2.2 La transcription	8
1.2.3 La formation des R-loops.....	9
1.2.4 L'endoribonucléase RNase HI	11
1.3 Les systèmes de réplication.....	13
1.3.1 Généralités.....	13
1.3.2 Le mode de réplication DnaA-indépendant ou cSDR.....	14
1.3.3 R-loops et expression génique.....	16
1.4 La Réponse SOS	17
1.4.1 Généralités	17
1.4.2 Les mutations provoquant la létalité lorsque combinées aux mutants <i>rnhA</i>	19
1.4.2.1 La létalité du double mutant <i>rnhA recB</i>	20
1.4.2.2 La létalité du double mutant <i>rnhA rep</i>	20
1.4.2.3 La létalité du double mutant <i>rnhA recG</i>	21
1.4.2.4 La létalité du double mutant <i>topA rnha</i>	22
1.5 La maturation et la dégradation des ARNs par les RNases	25

1.5.1 Généralités	25
1.5.2 Les RNases	26
1.5.3 L'endoribonucléase RNase E.....	27
1.5.3.1 Les voies de clivage de la RNase E	30
1.5.3.2 Les mutations synthétiques létales affectant l'activité de la RNase E	32
1.5.3.3 La régulation de l'expression et de l'activité de la RNase E	33
1.6 Le complexe multi-protéique : l'ARN dégradosome	34
1.6.1 Généralités.....	34
1.6.2 La polynucléotide phosphorylase : PNPase	35
1.6.3 L'hélicase RhlB	35
1.6.4 L'enzyme glycolytique : l'énolase	36
1.7 Objectifs	38
2. Matériels et Méthodes	39
2.1 Extraction d'ADN pour analyse de topoisomères plasmidiques.....	41
2.2 Cytométrie en flux	42
2.3 Mesure de l'habileté de différentes souches à former des colonies sur milieu solide (<i>Efficiency of Plating</i> : EOP)	44
2.4 Stries quantitatives sur milieu solide.....	45
2.5 Mesure de l'induction de la réponse SOS en déterminant le niveau d'expression du gène <i>sfiA</i> fusionné à <i>lacZ</i>	46
2.6 Mesure de l'activité RNase E des différents mutants <i>rne</i> en dosant la β -galactosidase d'une fusion T7- <i>lacZ</i>	47
2.7 Expérience de Southern blotting pour mesurer le ratio <i>oriC</i> / <i>Ter</i> chez différentes souches à l'étude.....	48
3. Résultats	50

3.1 Analyse des topoisomères des plasmides pBR322 et pPH1243 extraits des souches à l'étude – Impact de l'absence de la RNase HI au niveau du surenroulement de l'ADN.....	50
3.2 Caractérisation des supresseurs extragéniques localisés dans le gène <i>rne</i> et corrigeant le défaut de croissance du triple mutant <i>topA rnhA gyrB</i> (Ts) – Mesure de l'activité de la RNase E de ces mutants en dosant la β -galactosidase d'une fusion T7- <i>lacZ</i>	55
3.3 Effet des mutations <i>rne</i> sur la capacité d'une souche <i>rnhA</i> à survivre sans le système DnaA/ <i>oriC</i>	60
3.4 Effet des mutations <i>rne</i> sur la réponse SOS dans le mutant <i>rnhA</i>	67
3.5 Analyse par cytométrie en flux de la réplication dans nos différentes souches à l'étude.....	69
3.6 Mesure du niveau de cSDR chez nos supresseurs en analysant le ratio <i>oriC</i> / <i>Ter</i>	74
4. Discussion.....	78
4.1 La RNase HI joue un rôle majeur au niveau de la topologie de l'ADN.....	78
4.2 L'analyse du surenroulement de l'ADN révèle que le phénotype <i>rnhA</i> est dominant sur le phénotype <i>topA</i>	80
4.3 Le défaut d'assemblage du dégradosome aurait une influence sur l'activité de la RNase E en modulant l'accès à son substrat.	81
4.4 Il n'y a pas de corrélation entre le degré d'activité de la RNase E et sa capacité à réduire le cSDR.....	84
4.5 La diminution de la réponse SOS chez nos supresseurs est due à un effet négatif de ceux-ci sur les R-loops.....	86
4.6 La réduction du cSDR est étroitement liée à une suppression des sites <i>oriKs</i> localisés dans la région <i>Ter</i> , ceci ayant une incidence directe sur le ratio <i>oriC</i> / <i>Ter</i> dans les cellules.....	87
4.7 La voie de dégradation des ARNms empruntée par les supresseurs extragéniques dépend de la structure de leur RNase E.	88

4.8 La diminution du cSDR par nos supresseurs n'a aucune influence sur le degré de synchronisation du cycle cellulaire.....	90
5. Conclusion.....	93
6. Perspectives.....	95
7. Bibliographie	xvii
8. Annexe.....	xxxi

*Je dédicace ce mémoire à mon adorable fils
Alfred Emerick... Quelle richesse de t'avoir
dans ma vie!*

« A winner is a dreamer who never gives up »

Nelson Mandela

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord tous les membres du département de microbiologie, infectiologie et d'immunologie qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de ce cursus. . Tout particulièrement, mon directeur de recherche Dr. Marc Drolet qui m'a accepté dans son laboratoire; à tous les membres du laboratoire ainsi que les stagiaires et en particulier Valentine qui a été mon mentor durant toute cette période. Je tiens également à remercier Flora, Hourya, Christy et Claude-Marie pour ces moments inoubliables au laboratoire. A toutes mes amies (les membres de l'AttQ), je vous dis un gros merci pour vos encouragements. Enfin ceux, sans qui tout ceci n'aurait certainement pas été possible, ma famille. Papa, Maman, John et Angèle; mes chers Frères, Christian et Alfred, je vous suis sincèrement reconnaissante pour tous vos sacrifices et votre patience.

1. Revue de littérature

1.1 La structure de l'ADN

Une étude complète des processus génétiques qui se manifestent au sein de la cellule de tout organisme vivant doit nécessairement inclure un sommaire au sujet de l'ADN, support de l'information génétique et de l'hérédité. En effet, la double hélice que forme l'ADN a suscité de nombreuses recherches depuis les années 1930 (Snyder & Champness, 2003) concernant particulièrement sa structure jusque-là énigmatique. Ainsi, d'après le modèle de Francis Crick et James Watson de 1953, l'on sait que la molécule d'ADN pour acide désoxyribonucléique compte pour unité fondamentale un nucléotide, formant de ce fait un polymère de nucléotides. Ce dernier est composé d'une base pouvant être une purine (adénine-A et guanine-G) ou une pyrimidine (cytosine-C et thymine-T), d'un sucre (2-désoxyribose) et d'un groupement phosphate. Sous sa forme moléculaire, chaque brin d'ADN possède une séquence selon laquelle chaque groupement phosphate forme des liens phosphodiester entre 2 nucléotides. En effet, celui-ci est attaché au carbone en position 5' du désoxyribose du précédent nucléotide ainsi qu'au carbone en position 3' du nucléotide suivant (Snyder & Champness, 2003), d'où l'orientation 5'-3' des brins de l'ADN. Toutefois, en raison de l'antiparallélisme de la double hélice selon lequel les 2 brins s'engagent dans deux directions opposées, l'un présentera une orientation 5'-3', à l'inverse du second qui sera 3'-5'.

Afin de maintenir la structure de la double hélice, des liaisons hydrogènes entre les bases sont indispensables. En effet, selon la règle de Chargaff (Snyder & Champness, 2003) les ratios A/T et G/C sont toujours équivalents. De ce fait, la théorie sur la complémentarité des bases évoquée par Watson and Crick s'applique dans la mesure où chaque adénine est liée à une thymine par 2 ponts hydrogènes tandis que 3 ponts hydrogènes sont formés pour un lien impliquant une guanine à une cytosine (Watson & Crick, 1974). En somme, cette règle reposant sur la complémentarité des bases et par conséquent des brins qui constituent la double-hélice, est essentielle pour illustrer le principe de l'hérédité.

1.2 Le surenroulement de l'ADN

Par ailleurs, un véritable défi se pose lorsqu'il faut réussir à contenir cette double structure hélicoïdale d'approximativement 1 mm de longueur dans une bactérie ne mesurant que quelques micromètres. Effectivement, l'ADN est replié sur lui-même et compacté dans un espace tridimensionnel, qui est la cellule, expliquant ainsi la notion de surenroulement (Vos et al., 2011). En réalité, les deux brins sont enroulés chacun autour de l'autre donnant lieu à un « tour », toutes les 10.5 paires de base (pb) pour former la double hélice (Figure 1). On parlera d'un surenroulement négatif ou positif si les tours apparaissent après plus ou moins 10.5 (pb) respectivement (Vos et al., 2011) donnant ainsi lieu à la formation de supertours négatifs ou positifs (Figure 2).

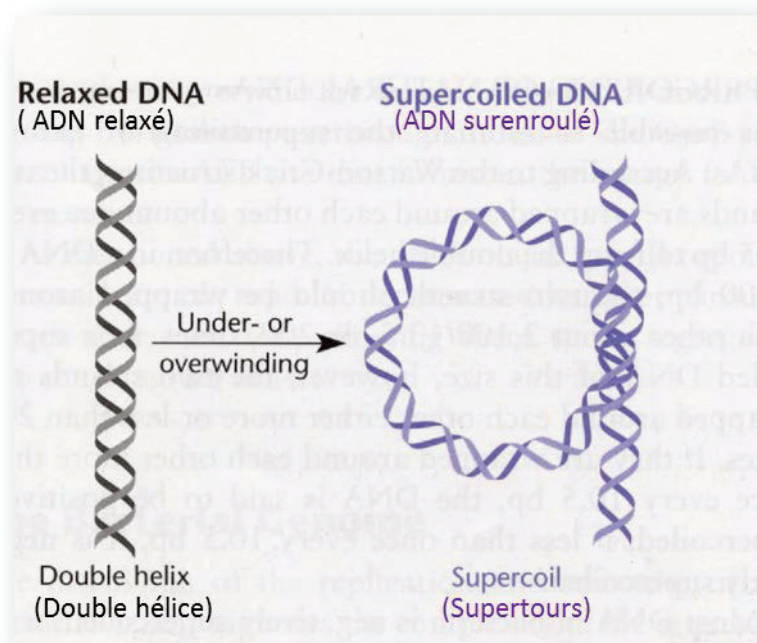


Figure 1 : Représentation de la double hélice d'ADN sous un aspect relaxé et surenroulé, adaptée de (Snyder & Champness, 2003)

Dans la plupart des organismes procaryotes, l'ADN est surenroulé négativement pour rendre possible les réactions de réplication, transcription et réparation. En effet, dans ce contexte l'ADN tend à être déroulé (séparation des brins) et devient ainsi plus accessible pour les enzymes d'intérêt tels que les polymérases ADN et ARN impliquées respectivement dans la réplication et la transcription.

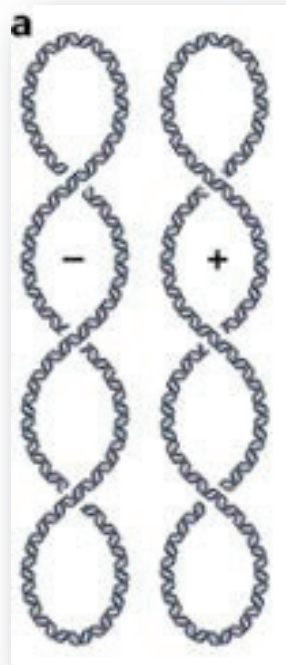


Figure 2 : Les deux types de surenroulement de la double hélice d'ADN.

Le surenroulement négatif est représenté à gauche et le positif à droite. Les deux formes se distinguent respectivement par leur emballage superhélicoïdal droit et gauche. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* de (Vos et al., 2011)

Le surenroulement de l'ADN est un facteur essentiel pour le métabolisme de la cellule et est ainsi rigoureusement régulé par le biais de certaines enzymes. Il est impliqué lors de

l'initiation de la réplication et de la transcription, particulièrement d'un certain nombre de gènes qui nécessitent un surenroulement négatif de l'ADN (Zechiedrich et al., 2000). Aussi, au cours de la phase d'élongation lors de la réplication, la séparation des deux brins et la progression de la machinerie enzymatique sont à l'origine d'une accumulation de surenroulement positif en aval de l'ADN polymérase; celui-ci devant impérativement être éliminé afin que le cycle de réplication soit dument complété (Wang, 1996). De plus, d'autres facteurs environnementaux peuvent perturber le niveau de surenroulement tels que le stress thermique (augmentation rapide de la température), le stress nutritionnel (conditions de croissance contribuant à la sporulation) et le stress chimique (contact avec des intercalateurs d'ADN tel que la chloroquine) (Drlica, 1992). En somme, le surenroulement de l'ADN affecte non seulement le mécanisme de séparation des brins, la liaison des protéines sur certains sites spécifiques mais favorise aussi, en condensant la double hélice, l'interaction de séquences éloignées (Vologodskii & Cozzarelli, 1994). Les enzymes qui modulent le niveau de surenroulement au niveau de la cellule appartiennent à la famille des topoisomérases, qui se divisent en deux types, I et II, selon qu'elles clivent respectivement un ou les deux brins de la double hélice (Vos et al., 2011) (Figure 3).

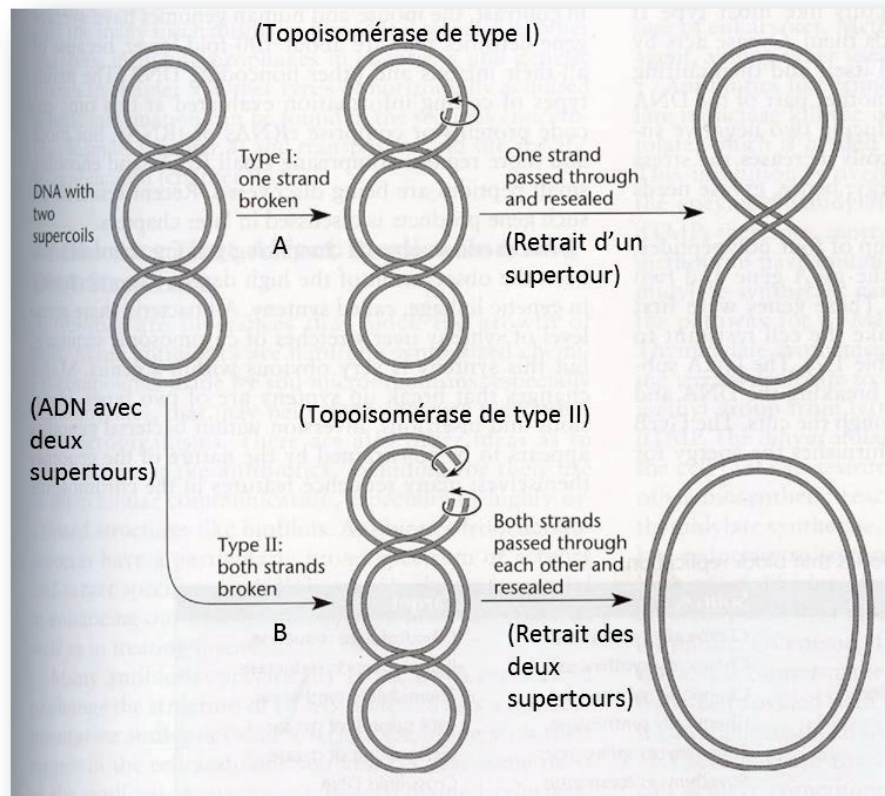


Figure 3 : Action de deux types de topoisomérases.

La topoisomérase de type I (A) provoque le clivage d'un seul brin au sein de la molécule d'ADN, éliminant un supertour à la fois. Par contre, la topoisomérase de type II (B) clive en même temps les deux brins de la double hélice, introduisant ou supprimant deux supertours à la fois, adapté de (Snyder & Champness, 2003).

1.2.1 Les Topoisomérases

Le surenroulement de l'ADN est étroitement régulé par les topoisomérases. Ces enzymes sont ubiquitaires chez tous les organismes vivants et par le fait même, elles deviennent la cible de plusieurs agents thérapeutiques d'origine naturelle ou synthétique. Chez les bactéries, à l'exemple de la souche *Escherichia coli*, quatre topoisomérases ont été

identifiées pour avoir un rôle crucial au niveau du contrôle de la topologie de l'ADN. Il s'agit de la topoisomérase I (topo I) encodée par le gène *topA* (Wang, 1971) et la topoisomérase III (topo III) encodée par le gène *topB* (Dean et al., 1983), qui appartiennent au type I (Drlica, 1992), tandis que la gyrase et la topoisomérase IV (topo IV) correspondent à la famille de type II. L'activité majeure de la topo I consiste à éliminer les supertours négatifs de l'ADN, présents entre autre en amont de l'ARN polymérase lors de la phase d'élongation durant la transcription (Wang, 1971) (Figure 4). De ce fait, le niveau de surenroulement de l'ADN chez les mutants *topA* est plus élevé (négativement) (DiNardo et al., 1982).

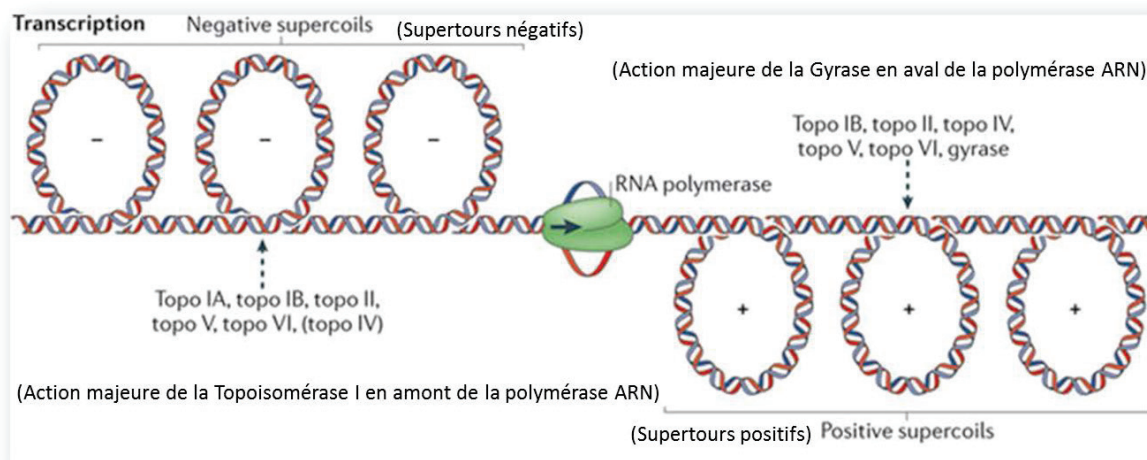


Figure 4 : Fonctions de la Topoisomérase I et de la Gyrase durant la transcription.

Des problèmes topologiques surviennent durant l'élongation de la transcription par la polymérase ARN. Ainsi, les supertours négatifs et positifs créés respectivement en amont et en aval de cette polymérase sont majoritairement éliminés par l'action respective de la topoisomérase I et de la gyrase. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* de (Vos et al., 2011)

Quant à la topo III, elle pourrait résoudre les intermédiaires de liaisons simple-brin (hémicatenanes) en collaborant avec l'hélicase RecQ et les intermédiaires qui surviennent

durant la réplication (convergence des fourches de réplication) ou la réparation de l'ADN (Harmon et al., 1999). Il est important de mentionner que l'hélicase RecQ permet d'ouvrir la double hélice afin de fournir le substrat à la topo III (Vos et al., 2011).

En ce qui concerne la famille de type II, la gyrase et la topoisomérase IV sont toutes deux essentielles pour la viabilité de la cellule (Levine et al., 1998). La topo IV est constituée de deux sous-unités encodées par les gènes *parC* et *parE* respectivement homologues aux gènes *gyrA* et *gyrB* qui correspondent aux deux sous-unités de la gyrase (Zechiedrich et al., 2000). La gyrase représente la principale topoisomérase de type II, étant donné sa capacité à introduire du surenroulement négatif (activité nécessitant de l'énergie fournie par la sous-unité ATPasique GyrB), qui sera requis pour initier la réplication en plus de relaxer les supertours positifs qui apparaissent notamment en aval de l'ADN polymérase. Ceci facilitera la progression des fourches de réplication (Gellert et al., 1976). En revanche, la topo IV est étroitement liée à la résolution des caténanes, intermédiaires formés lors de la fin d'un cycle de réplication, contribuant ainsi à la ségrégation des deux chromosomes filles (Adams et al., 1992) (Figure 5).

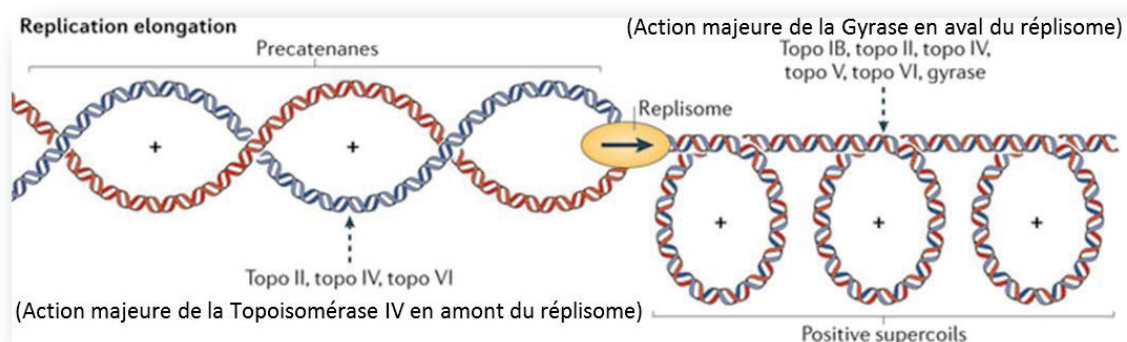


Figure 5 : Fonctions des topoisomérases de type II durant la réplication de l'ADN.

Lors de la progression des fourches de réplication, des pré-caténanes et du surenroulement positif se forment respectivement en amont et en aval du complexe. S'ils ne sont pas pris en charge, ces pré-caténanes peuvent donner lieu à deux chromosomes filles entremêlés

(caténanes), celles-ci étant à l'origine d'un problème de ségrégation. D'autre part, le surenroulement positif s'il n'est pas relaxé par la gyrase peut interférer au niveau de la progression des fourches de réplication et causer un arrêt prématuré de la réplication de l'ADN. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* de (Vos et al., 2011)

1.2.2 La transcription

La molécule d'ADN telle que décrite ci-dessus contient l'information nécessaire pour la synthèse des ARNs en premier lieu puis celle des protéines. La transcription est donc le processus qui se caractérise par la synthèse d'ARNs par l'enzyme ARN polymérase à partir des séquences codantes du brin d'ADN matrice. Chez les bactéries, on décompte environ 2000 molécules d'ARN polymérase par cellule; les trois types d'ARNs, ARNs ribosomaux, de transfert et messagers, sont tous générés à partir de la même polymérase ARN (Snyder & Champness, 2003). D'autre part, cette holoenzyme de 400 kDa possède 5 sous-unités dont 4 permanentes α , α , β , β' ainsi que le facteur σ qui est requis uniquement pour l'initiation de la transcription. De ce fait, l'ARN polymérase se fixe à des régions spécifiques, dites promotrices (-35) et (-10) en amont du site de départ sur le brin d'ADN matrice d'orientation 3'→5', la réaction de polymérisation s'effectuant de 5'→3' (Snyder & Champness, 2003).

Durant la transcription, à cause de la nature hélicoïdale de l'ADN, deux scénarios mutuellement exclusifs peuvent être envisagés : 1-l'ARN polymérase effectue des rotations le long de la double-hélice et 2- c'est la double-hélice qui tourne, générant ainsi du surenroulement négatif en arrière et positif en avant de l'ARN polymérase. À cause de la masse imposante de l'ARN polymérase, c'est le deuxième scénario qui se produit (Liu & Wang, 1987). Ainsi, la transcription modifie de façon transitoire le niveau de surenroulement de l'ADN tout au long du déplacement de la polymérase. C'est dans cette optique qu'apparaît le rôle crucial des topoisomérases de type I et II, respectivement la topoisomérase I et la gyrase au niveau de la régulation du surenroulement local dans la

cellule. Cette régulation très étroite a été mise en évidence par un modèle reposant sur deux observations concernant la topologie du plasmide pBR322 chez la souche *Escherichia coli* : une inhibition de la gyrase entraîne la formation de plasmides positivement surenroulés (Lockshon & Morris, 1983) tandis que la transcription du gène *tet* (gène encodant la cassette de résistance à la tétracycline) chez des souches dépourvues de la topoisomérase I ($\Delta topA$) donne lieu plutôt à une accumulation d'une population hétérogène de topoisomères du plasmide pBR322, dont certains sont hyper-négativement surenroulés (Pruss & Drlica, 1986). Ainsi, en l'absence de la topoisomérase I ($\Delta topA$), la relaxation du surenroulement positif généré en aval du gène *tet* par la gyrase cause l'accumulation de plasmides hyper-surenroulés négativement, tandis que lorsque la gyrase est inhibée la relaxation du surenroulement négatif généré en amont de ce gène entraîne l'accumulation de plasmides surenroulés positivement. L'encrage à la membrane de la protéine Tet naissante durant la transcription (transcription et traduction couplée chez les bactéries) inhibe complètement la rotation de l'ARN polymérase, favorisant ainsi l'accumulation de surenroulement (Drolet et al., 2003)

C'est ainsi que les activités antagonistes de la gyrase et de la topoisomérase I jouent un rôle crucial dans la régulation rigoureuse de cette dynamique qui se crée lors de la transcription (*twin-domain model*; (Liu & Wang, 1987)).

1.2.3 La formation des R-loops

Les R-loops se définissent comme des structures au sein desquelles l'ARN forme un hétéroduplexe avec l'un des brins de la double hélice d'ADN (Drolet et al., 1995). En effet, *in vivo* les R-loops sont formés lorsque l'ARN nouvellement transcrit forme un hybride avec le brin d'ADN matrice, le brin d'ADN complémentaire demeurant une molécule simple brin. Il a été démontré que le niveau de surenroulement de l'ADN influence la formation de cette structure. Effectivement, le surenroulement négatif favorisant la séparation des brins, permettra le ré-appariement de l'ARN naissant avec le brin matrice

pour ainsi former un R-loop (Massé & Drolet, 1999b). Ainsi, la conséquence majeure du surenroulement négatif généré en amont de l'ARN polymérase sera la formation de R-loops (Drolet, 2006; Massé & Drolet, 1999b).

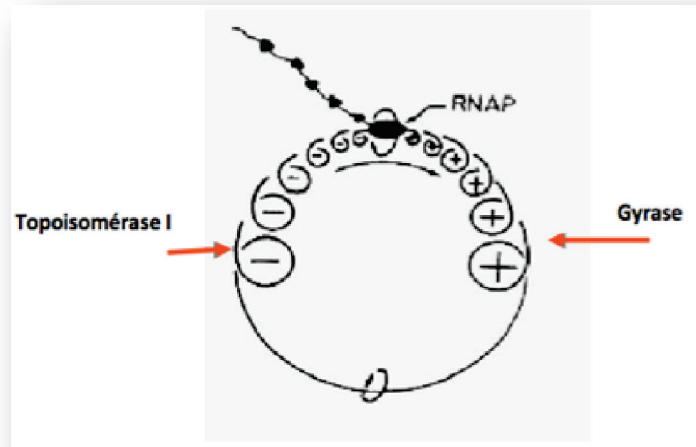


Figure 6 : Modèle « *twin supercoiled domain* »

Selon ce modèle, le déplacement de l'ARN polymérase lors de la transcription génère un excès de surenroulement positif et négatif à l'avant puis à l'arrière du complexe de transcription, respectivement. Pour palier à ces modifications, la cellule va recruter deux topoisomérases aux fonctions antagonistes. Il s'agit d'une part de la gyrase qui par un processus actif va introduire du surenroulement négatif en amont de l'ARN polymérase tandis que la topoisomérase I va relaxer l'ADN surenroulé négativement en aval du complexe. Figure adaptée de (Liu & Wang, 1987).

De plus, la formation des R-loops qui est favorisée par un excès de surenroulement négatif, présente un lien étroit avec le défaut de croissance des mutants *topA*. Cela fait ressortir une fonction majeure de cette topoisomérase, qui serait de prévenir toute accumulation d'un excès de surenroulement négatif généré lors de l'élongation de la transcription, dans le but d'inhiber l'apparition de R-loops, et de permettre l'expression des gènes (Drolet, 2006). Ainsi, les mutants *topA* peuvent croître lorsque la RNase HI, enzyme dégradant

spécifiquement l'ARN des R-loops, est surproduite dans la cellule (Drolet et al., 1995). Dans le même ordre d'idée, le double mutant *topA rnhA* (code pour la RNase HI) est non-viable (Drolet et al., 1995; Usongo et al., 2008).

Aussi, la formation des R-loops est fortement influencée par la séquence nucléotidique. Ainsi, des R-loops très stables seraient issus d'un ARN dont le contenu en base serait riche en guanine (G) (Drolet, 2006); ceci s'expliquerait par la remarquable stabilité des hybrides rG :dC (Sugimoto et al., 1995). De plus, le découplage entre la transcription et la traduction causé soit par l'addition d'inhibiteurs de synthèse protéique (antibiotique chloramphénicol par exemple) ou par l'inactivation du site de fixation des ribosomes sur l'ARN messenger, favorise la formation des R-loops (Broccoli et al., 2004; Massé & Drolet, 1999b). Ceci suggère fortement que la présence de ribosomes sur l'ARN nouvellement synthétisé, préviendrait l'hybridation de ce dernier avec le brin d'ADN matrice. Chez les procaryotes, les ribosomes sont considérés comme des molécules senseurs dans la réponse aux stress thermiques (« *heat* » et « *cold shock* ») et seraient inactivés en réponse à ces chocs thermiques, à l'origine du découplage entre la transcription et la traduction (Massé & Drolet, 1999c). En somme, les différents stress que subirait la cellule contribueraient à la formation des R-loops. Ils pourraient également stimuler l'activité de surenroulement de la gyrase en réponse à une augmentation du ratio ATP/ADP (Drlica, 1992).

1.2.4 L'endoribonucléase RNase HI

Afin de remédier à tout potentiel d'inhibition de croissance due à l'accumulation de R-loops dans la cellule, la fonction de la RNase HI qui est une endoribonucléase omniprésente chez les eucaryotes, procaryotes et archaea, devient cruciale. En effet, cette enzyme codée par le gène *rnhA*, digère l'ARN des hybrides ARN/ADN qu'elle reconnaît de façon spécifique (Kogoma, 1994). Par ailleurs, une des premières fonctions qu'on lui a attribuée consistait à digérer les amorces d'ARN des fragments d'Okasaki utilisées durant la réplication afin de préserver l'intégrité du brin d'ADN (discontinu) nouvellement

synthétisé. Cependant, son activité d'endoribonucléase s'est avérée insuffisante pour ôter les deux derniers ribonucléotides au niveau des jonctions ARN-ADN. En réalité, c'est l'activité d'exonucléase 5'→3' de la polymérase ADN I (*polA*) qui élimine l'ARN des fragments d'Okasaki dans la cellule (Fukushima et al., 2007). En somme, la RNase HI ne joue qu'un rôle auxiliaire dans le retrait des amorces ARN des fragments d'Okasaki (Ogawa & Okazaki, 1984).

L'une des fonctions essentielles de la RNase HI réside dans la digestion des transcrits d'ARN formant les hybrides ARN/ADN. En effet, la dégradation de ces R-loops empêcherait l'initiation de la réplication à d'autres régions du chromosome que le site normal *oriC* (Kogoma, 1997) (Figure 7).

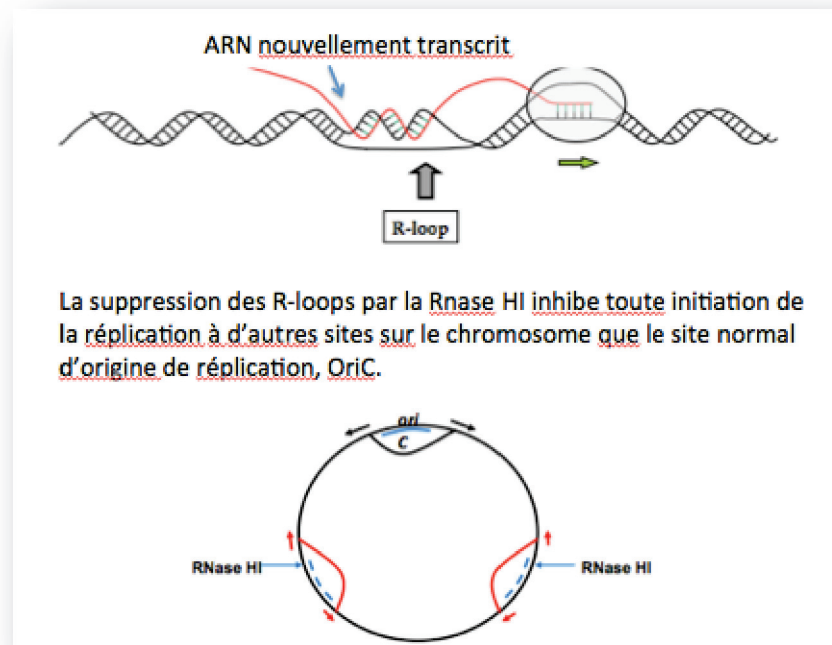


Figure 7 : Suppression de R-loops sous l'action de la RNase HI.

La RNase HI dégrade l'ARN des hybrides ADN/ARN qui peuvent à l'origine de l'initiation d'un complexe de réplication bidirectionnel ailleurs qu'au niveau de la séquence normale *oriC*.

1.3 Les systèmes de réplication

1.3.1 Généralités

Tout d'abord, il existe plusieurs modes alternatifs de réplication chez la bactérie *Escherichia coli* en plus du mode 'normal' de réplication (*oriC*/DnaA; voir plus bas). En fait, on en dénombre trois, dont le iSDR (*inducible stable DNA replication*), le cSDR (*constitutive stable DNA replication*) ainsi que le nSDR (*nutritional shift-up-activated SDR*); ceux-ci diffèrent les uns des autres par les protéines requises ainsi que par le mode d'assemblage de la fourche de réplication (Kogoma, 1997).

Chez les bactéries, l'initiation de la réplication se produit suite à la fixation de la protéine initiateur DnaA à la région répétitive de neuf paires de bases (boîtes DnaA), constituant le site d'origine *oriC*, localisé à la 83.5^{ième} minute du chromosome d'*E. coli* (Kogoma, 1997). Les produits des gènes *dnaB* et *dnaC* sont également impliqués dans ce processus, DnaC servant à charger DnaB, l'hélicase répllicative, au site *oriC*. Par ailleurs, ce mode de réplication DnaA-dépendant, requiert la synthèse protéique et d'ARN *de novo* pour être actif. Il sera donc inhibé par des inhibiteurs de synthèse protéique, (e.g. le chloramphénicol) et d'ARN (e.g. la rifampicine) (von Meyenburg et al., 1979).

Le terme SDR pour '*stable DNA replication*' a été formulé pour décrire la capacité de la cellule à procéder à la réplication du chromosome sans la participation de la synthèse protéique *de novo* (Kogoma & Lark, 1970; 1975). On s'attardera davantage ici sur le cSDR (constitutive SDR) car celui-ci est un phénotype majeur dû à l'absence de la RNase HI (mutants *rnhA*). Ainsi, dans les mutants *rnhA*, la synthèse d'ADN peut se poursuivre plusieurs heures après l'ajout d'un inhibiteur de synthèse protéique (d'où le terme «stable»). Il a été stipulé plus haut que la réplication peut survenir dans des sites autres que la région *oriC*, ces sites sont entre autres les sites *oriK* formés suite à l'hybridation d'un

transcrit ARN sur un brin d'ADN matrice (R-loop) chez des mutants *rnhA*; tout ceci se produisant selon le mode de réplication cSDR (Kogoma, 1997). On dénombre au moins cinq sites *oriK* à travers le chromosome incluant deux au niveau de la région *terC* (région de terminaison de la réplication du chromosome). Les mutants *rnhA* peuvent survivre à la délétion d'*oriC* et/ou *dnaA*, grâce à la réplication cSDR initiée à partir des R-loops que constituent ces sites *oriK* (voir plus bas).

1.3.2 Le mode de réplication DnaA-indépendant ou cSDR

Le cSDR est un système de réplication qui nécessite la participation de plusieurs protéines telles que RecA, PriA, DnaB, DnaG, etc. et bien évidemment de la synthèse d'ARN (dans les R-loops). La région ADN simple-brin du R-loop est utilisée par la protéine PriA pour charger un complexe de réplication identique en tous points au complexe assemblé à *oriC*. La différence entre ces deux modes réside donc au niveau de la première étape soit l'interaction de DnaA avec *oriC* pour le mode normal, et l'interaction de PriA avec l'ADN simple brin du R-loop pour le mode cSDR (Kogoma, 1997). Le cSDR est résistant à l'antibiotique chloramphénicol, contrairement au mode *oriC*/DnaA mais est sensible à la rifampicine tout comme le mode normal (Kogoma, 1978; von Meyenburg et al., 1987). La protéine RecA serait utilisée à l'étape d'initiation lorsque le R-loop est stabilisé dû à l'absence de la RNase HI (Kogoma, 1997).

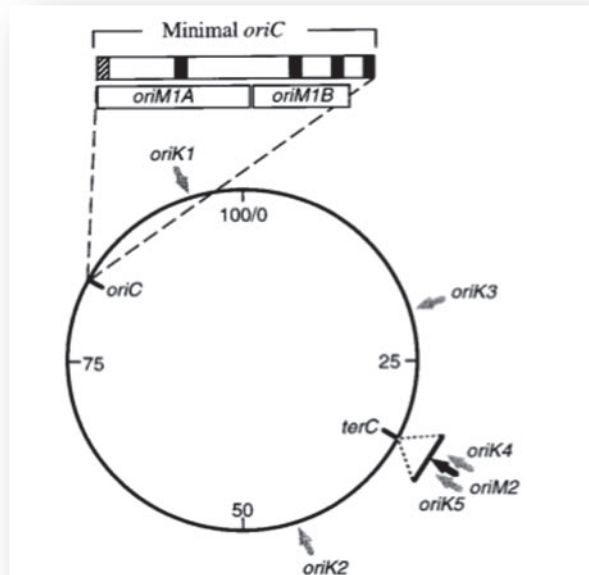


Figure 8 : Illustration des sites *oriK* et *oriM* à travers le chromosome d'*E. coli*.

Les sites *oriK*, à partir desquels il y'a initiation du cSDR (constitutive stable DNA replication) sont majoritairement localisés au niveau de la région *terC*. Les rectangles en gras et la zone hachurée représentent respectivement le cluster AT-riche et la boîte DnaA. Figure adaptée de (Kogoma, 1997) © American Society for Microbiology.

Tableau 1 : Comparaison des systèmes de réplifications chez *E. coli*

Prérequis	Systèmes de répllication	
	DnaA/ <i>oriC</i> Origine : <i>oriC</i>	cSDR Origine : sites <i>oriK</i>
DnaA	+	-
DnaB	+	+
Complexe DnaC avec DnaB	+	+
DnaG	+	+
ADN polymérase III	+	+
PriA	-	+
ADN polymérase I	-	+
RecA	-	+
Synthèse protéique	+	-
Synthèse d'ARN	+	+

Légende: (+) requis pour le système et (-) non requis

La figure 8 illustre les modes de réplication alternatifs et le tableau 1 énumère les protéines requises pour ces différents modes.

Par ailleurs, tel que mentionné auparavant les mutants *rnhA* peuvent survivre en l'absence du mode de réplication *oriC*/DnaA grâce à la présence de sites *oriK* pour le mode cSDR. Cependant, cela entraîne un taux de croissance réduit de 30 à 40 % et une diminution importante de la quantité d'ADN par cellule (von Meyenburg et al., 1987). Un autre aspect important du mode de réplication cSDR est son asynchronisme. En effet, dans les cellules normales (ayant une réplication au site *oriC*) l'initiation de la réplication est synchronisée avec la masse d'initiation durant le cycle cellulaire. Ainsi, pour une croissance cellulaire en phase logarithmique, on se retrouvera avec une population de cellules contenant 2, 4 ou 8 chromosomes, cela dépendant du temps de génération (richesse du milieu). Donc, l'initiation à toutes les origines se faisant de façon simultanée, il y'aura à la fin 2^n chromosomes par cellule ($n=1, 2, 3$). Si en revanche l'initiation est aléatoire dans le sens où elle ne dépend pas de la masse cellulaire, on obtiendra une population de cellules contenant un nombre irrégulier ($\neq 2n$) de chromosomes, tel qu'observé chez les cellules utilisant le mode cSDR (Skarstad et al., 1986).

1.3.3 R-loops et expression génique

En outre, la RNase HI est également impliquée dans l'expression des gènes via les R-loops. Il est ici nécessaire de se rappeler que l'un des paramètres important dans la formation des R-loops est le surenroulement négatif. Ainsi, un des phénotypes majeurs qui accompagne l'inhibition de la croissance chez les mutants *topA* demeure l'incapacité pour ces cellules à accumuler les ARNs d'une pleine longueur, que ce soient des ARNs messagers (Baaklini et al., 2004) ou ribosomaux (Hraiky et al., 2000). De ce fait, il a été démontré qu'une surproduction de la RNase HI corrige ce problème (accumulation d'ARNs tronqués), en

d'autres termes, la correction de ce phénotype par la surproduction de la RNase HI signifient que les R-loops se présentent comme un obstacle lors de l'élongation de la transcription par la polymérase ARN (Drolet, 2006). Néanmoins, il faudrait que le R-loop soit assez stable pour se présenter comme un obstacle pour la polymérase suivante et donc affecter d'une manière significative l'expression génique.

Conformément aux énoncés ci-dessus, les mutants *rnhA* présentent des R-loops qui persistent au sein de leur génome. Ceux-ci sont à l'origine du cSDR puisqu'ils deviennent des origines de réplication potentielles (sites *oriK*). Dès lors, plusieurs problèmes peuvent survenir dans la cellule étant donné la dérégulation du cycle cellulaire. Tout d'abord, des fourches de réplication peuvent entrer en collision les unes avec les autres ce qui aura pour effet de déclencher la réponse SOS, réponse aux stress de dommages à l'ADN. En effet, il y aura un recrutement de la protéine RecA sur les brins d'ADN en arrière des fourches arrêtées, ce qui entraînera l'induction de la réponse SOS (Kogoma, 1997).

1.4 La Réponse SOS

1.4.1 Généralités

L'induction de la réponse SOS implique plus de 40 gènes tels qu'*uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *ruvAB* ...*sulA* (nommé autrefois *sfiA*) (McCool et al., 2004). Celle-ci est régulée par le répresseur transcriptionnel LexA et la co-protéase activatrice RecA (Janion, 2008). Nombreux sont les facteurs capables de déclencher la réponse SOS, soient les radiations UVs, des produits chimiques qui endommagent la structure de l'ADN tels que le méthyle sulfonate de méthane (MSM). Le plus pertinent pour la cellule est l'accumulation d'ADN simple-brin (Janion, 2008) résultant d'un arrêt prématuré des fourches de réplication (van der Veen & Abee, 2011). La protéine RecA d'*E. coli* se présente sous forme de monomère et elle possède une activité ATPasique ADN-dépendante lui permettant de se lier à l'ADN (Lusetti & Cox, 2002). De cette façon, les monomères de RecA se caractérisent par une forte

tendance à polymériser pour former des filaments de nucléoprotéines (Arenson et al., 1999; Schlacher et al., 2006). Aussi, le processus d'assemblage de RecA sur un ADN simple-brin nécessite de l'ATP (Lusetti & Cox, 2002). Cette polymérisation se fait dans la direction de 5'→3' à un ratio de 1 molécule de RecA pour 3 bases d'ADN (Janion, 2008). De ce fait, lorsqu'un dommage à l'ADN est perçu dans la cellule suite à la liaison de la protéine RecA avec l'ADN simple-brin, il en résulte la formation du complexe filamentueux RecA-ADNsb¹. Celui-ci agira comme effecteur allostérique pour l'auto-clivage du répresseur transcriptionnel LexA (McCool et al., 2004). En effet, une fois la protéine RecA assemblée sur l'ADNsb, elle acquiert une activité de coprotéase indispensable pour l'auto-clivage de LexA, entraînant une dérégulation des gènes régulés par la réponse SOS. Par ailleurs, la protéine LexA possède une faible activité catalytique d'auto-clivage. Cependant, son clivage de même que la dérégulation des gènes qui sont sous son contrôle ne surviennent qu'en présence de la coprotéase RecA (Janion, 2008).

Les mutants *rnhA* expriment de façon constitutive la réponse SOS qui devient sévère lorsque les souches sont cultivées sur un milieu riche (LB²). Effectivement, des études chez les mutants *rnhA224* et *rnhA339::cat*, où l'activité de la RNase HI est absente, démontrent que ceux-ci expriment de façon chronique la fusion transcriptionnelle *sfiA::lacZ*³ selon un processus RecA⁺ et LexA⁺-dépendant (Kogoma et al., 1993). En réalité, les R-loops stables chez les mutants *rnhA*, deviennent des obstacles pour le déplacement des fourches de réplication, provoquant ainsi un arrêt prématuré du réplisome (Kogoma, 1997). Tout ceci sera à l'origine d'un processus de réparation de cassure double-brin RecA-dépendant qui permettra de remodeler le bris apparu au niveau du réplisome et régénérer ainsi un

¹ ADNsb : ADN simple-brin.

² LB : Luria-Bertani

³ sfiA::LacZ : fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène *sfiA* sous le contrôle de la protéine LexA et le gène rapporteur *lacZ* qui code pour l'enzyme β -galactosidase, dont l'hydrolyse du substrat (IPTG) donne un composé jaune (o-nitrophenyl- β -galactoside) quantifiable par spectrophotométrie. L'IPTG ou isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside est un analogue de l'allolactose, inducteur de l'opéron Lac.

complexe de réplication viable (Lusetti & Cox, 2002). Effectivement, lors de ce mécanisme de réparation mis en branle suite à une collision de fourches, le complexe RecBCD grâce à son activité d'hélicase, va dérouler une extrémité double-brin afin de libérer le substrat pour la protéine RecA. En effet, l'ADN simple-brin ainsi mis à nu, va permettre le recrutement de RecA et par la même occasion déclencher la réponse SOS. Dans ce mécanisme, le système de relance employé par la protéine PriA est également utilisée pour mobiliser les protéines DnaB et DnaC afin de relancer les fourches de réplication (Kogoma, 1997).

En outre, l'intensité de la réponse SOS est également modifiée suite à un changement de conditions de croissance. En effet, chez les mutants *rnhA::cat*, on observe une augmentation du niveau d'expression du régulon SOS de 3 fois lorsque la croissance se fait dans un milieu minimal et de 5 fois lorsque celle-ci a lieu dans un milieu LB, par rapport au niveau d'expression chez des souches sauvages (Kogoma, 1997). Les cellules qui poussent dans un milieu riche se distinguent par une plus grande activité de réplication ce qui augmente les probabilités de collision entre les fourches (Lusetti & Cox, 2002).

1.4.2 Les mutations provoquant la létalité lorsque combinées aux mutants *rnhA*

Tel qu'énoncé ci-dessus, la RNase HI est une enzyme cruciale pour le métabolisme des R-loops. D'ailleurs son absence dans la cellule provoque le recrutement d'une panoplie de protéines impliquées la plupart dans des mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, ceci est dû à une récurrence importante (surtout en milieu riche) de l'arrêt prématuré des fourches de réplication. Par conséquent, si dans une cellule l'on combine la mutation *rnhA* avec une autre impliquant un gène codant pour une de ces protéines de réparation, ceci pourrait être létal. La létalité pourrait également se manifester si la mutation additionnelle affecte un autre gène impliqué dans la répression des R-loops. De cette façon, les mutations *rnhA* sont d'une manière synthétique létale lorsqu'elles sont combinées avec des mutations

d'autres gènes tels que *recB* (Itaya & Crouch, 1991), *recG* (Hong et al., 1995), *rep* (Sandler, 2005) et *topA* (Drolet et al., 1995).

1.4.2.1 La létalité du double mutant *rnhA recB*

Dans le cas du gène *recB*, son rôle dans le processus de réparation des cassures double-brin dues entre autres à des collisions de fourches en raison des R-loops, explique ce phénomène de létalité (Kogoma et al., 1993). Effectivement, RecBCD est une enzyme multifonctionnelle dont les fonctions impliquent d'une part une reconnaissance de la séquence spécifique Chi⁴, une activité nucléolytique ATP-dépendante des substrats ADNsb et ADNdb⁵ et une activité ADN hélicase (Kogoma, 1997). Ainsi, tandis que la mutation *recD* inactive l'activité d'exonucléase du complexe enzymatique, la mutation *recB* abolit en plus de l'activité d'exonucléase, la capacité de recombinaison relevant de la fonction d'hélicase (Kogoma et al., 1993). En effet, l'activité d'hélicase de RecBCD est essentielle pour l'initiation de la recombinaison homologue en générant des bouts d'ADNsb qui sont pris en charge par la protéine RecA (Kogoma, 1997). Donc, en l'absence de la RNase HI et de l'activité d'hélicase dérivant du gène *recB*, les mécanismes de recombinaisons homologues qui sont essentiels pour la viabilité du mutant *rnhA*, et ce particulièrement dans un milieu riche, ne fonctionnent pas (Itaya & Crouch, 1991).

1.4.2.2 La létalité du double mutant *rnhA rep*

En ce qui concerne le gène *rep*, ce dernier présente deux rôles dans la cellule : la stabilisation des fourches de réplication et sa participation dans le mécanisme de redémarrage de réplication PriA-indépendant (Sandler, 2005) d'où la létalité lors de la

⁴ Sites Chi : séquences très présentes dans le chromosome d'*E.coli* à environ une fois tous les 4kb en moyenne.

⁵ ADNdb : ADN double-brin.

combinaison de cette mutation avec celle du gène *rnhA*. En réalité, il existe chez la souche *E. coli*, au moins deux modes de redémarrage des fourches de réplication d'ADN au niveau des intermédiaires de recombinaison, soit les processus PriA-dépendant et PriA-indépendant (Sandler, 2000). Le premier requiert les gènes *priA*, *priB* ou *priC* tandis que le second requiert les gènes *priC* ou *rep* (Sandler, 2000). En effet, la protéine Rep possède une activité hélicase 3'→5' (Lohman & Bjornson, 1996), toutefois, celle-ci n'est pas essentielle pour la réplication d'ADN. L'absence de la fonction de cette protéine serait plutôt à l'origine d'un arrêt plus fréquent des fourches de réplication (Michel, Ehrlich, & Uzzest, 1997). De ce fait, si on assume que le processus de redémarrage des fourches de réplication au niveau des intermédiaires de recombinaison demeure essentiel pour la croissance de la cellule (Sandler, 2000), ceci expliquerait la non-viabilité des doubles mutants *rnhA rep*.

1.4.2.3 La létalité du double mutant *rnhA recG*

Pour ce qui est du gène *recG*, celui-ci code pour une hélicase ADN qui dissocie spécifiquement les jonctions synthétiques X (pour 4 embranchements) et Y (pour 3 embranchements) des jonctions d'Holliday⁶ (Lloyd & Sharples, 1993; Whitby et al., 1994). Cette hélicase est également impliquée dans la résolution de ces intermédiaires de recombinaison en catalysant la migration de branches en sens inverse (Whitby et al., 1993). De plus, la protéine RecG est capable de dissocier des D-loops et des R-loops. Une trop grande abondance de R-loops stables entraînant trop de cSDR expliquerait la létalité d'un double mutant *rnhA recG* (Hong et al., 1995; on observe du cSDR dans les mutants *recG*) (Figure 9).

⁶ Jonctions d'Holliday: Intermédiaire de recombinaison proposé par Robin Holliday en 1964 qui se produit lorsqu'un brin de chaque molécule d'ADN se coupe simultanément et au même locus ce qui entraîne un échange de ces brins, leur appariement homologue puis leur ligation afin de former cette structure d'ADN.

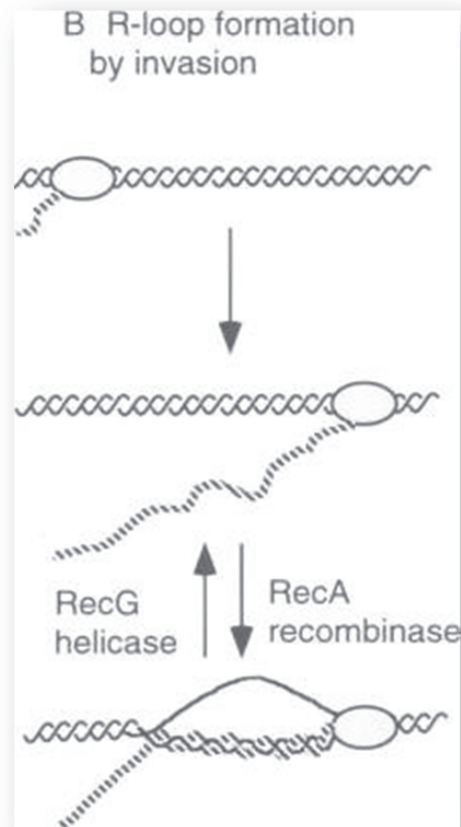


Figure 9 : Modèle de formation d'un R-loop par invasion.

Ce modèle illustre la formation d'un R-loop stable suite à l'invasion d'un duplex d'ADN par un transcrit d'ARN nouvellement synthétisé. Les lignes pleines ondulées représentent le duplex d'ADN; les lignes en pointillé, le transcrit d'ARN; la structure ovale, l'ARN polymérase. Figure adaptée avec permission de *Nature Publishing Group* de (Hong et al., 1995).

1.4.2.4 La létalité du double mutant *topA rnhA*

Enfin, concernant le gène *topA* qui code pour la topoisomérase I, il a été mentionné plus haut qu'une de ses fonctions essentielles est la prévention de l'accumulation d'un excès de

surenroulement négatif dû à l'élongation de la transcription, ce qui a comme effet principal la formation de R-loops (Massé & Drolet, 1999a). En effet, la formation de R-loops dépendante de l'ADN hyper-négativement surenroulé a été mise en corrélation avec le défaut de croissance de plusieurs mutants *topA*. Ainsi, une des activités majeures de la topoisomérase I serait la relaxation du surenroulement négatif induit par la transcription afin d'inhiber la formation des R-loops (Massé & Drolet, 1999a, 1999b). De la même manière, chez les mutants *rnhA*, ce surenroulement négatif entraîne la re-hybridation de l'ARN nouvellement transcrit avec un des brins d'ADN; délaissant l'autre brin non-apparié ce qui relaxe la double hélice (Usongo et al., 2008). L'ADN relaxé est un substrat pour la gyrase, qui y introduirait des supers-tours négatifs en présence d'ATP⁷. Donc, plus la formation de R-loop est importante, plus l'ADN sera relaxé et ceci augmentera l'activité de surenroulement de la gyrase (Drolet, 2006; Drolet et al., 1994; Phoenix et al., 1997) (Figure 10). Dans ce contexte, il y aurait incompatibilité entre les mutations *rnhA* et *topA*, ainsi donc l'impossibilité de construire ce double mutant n'a pas été une surprise (Drolet et al., 1995; Massé & Drolet, 1999b) sachant que ces cellules seraient sujettes à un niveau toxique d'excès de surenroulement négatif. En revanche, après avoir réussi à construire des doubles mutants *rnhA topA* où la RNase HI est exprimée à partir d'un plasmide exprimant *rnhA* sous le contrôle d'un promoteur P_{BAD} inductible à l'arabinose, il a été plutôt observé sous des conditions non-permissives⁸ que l'ADN était relaxé et non hyper-négativement surenroulé. Ainsi, une baisse d'activité de la RNase HI chez les mutants *rnhA* provoquerait une réponse cellulaire qui entrainerait l'inhibition de l'activité de surenroulement de la gyrase (Usongo et al., 2008). Ceci témoigne de l'effet majeur que la RNase HI peut avoir sur la topologie de l'ADN. Il est également important de mentionner que cet excès de

⁷ ATP : L'Adénosine-5'-triphosphate est une molécule organique formée d'un sucre (ribose), d'une base azotée (adénine) et de trois groupements phosphates. L'hydrolyse de ce nucléotide triphosphate libère une grande quantité d'énergie.

⁸ Conditions non-permissives : conditions ne permettant pas l'expression du gène *rnhA* fusionné au promoteur P_{BAD}. En présence d'arabinose, molécule inductrice il y'a régulation positive de la transcription et donc expression de la RNase HI.

relaxation de l'ADN n'est pas en corrélation avec la concentration cellulaire des enzymes gyrase et topoisomérase IV (autres enzymes qui relaxent l'ADN dans la cellule) ou encore avec la transcription qui a un impact sur le niveau de surenroulement (Usongo et al., 2008).

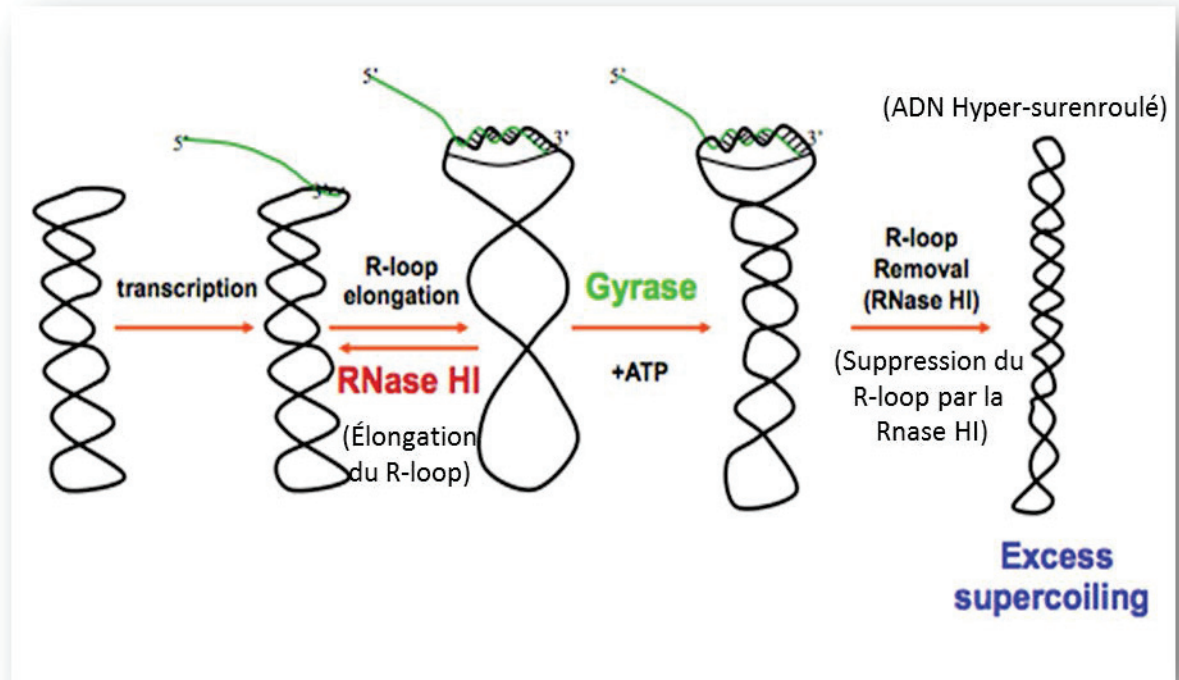


Figure 10: Régulation du niveau de surenroulement de l'ADN par la RNase HI et la gyrase.

Ce modèle illustre le retrait des R-loops par la RNase HI et son rôle crucial dans la régulation du surenroulement de l'ADN et ce à travers l'activité de la gyrase.

Suite à cela, au moyen de la technique de mutagenèse au transposon Tn5 (Larsen, 2002), il a été possible d'isoler plusieurs suppresseurs extragéniques corrigeant le défaut de croissance associé au double mutant *topA rnhA* (Usongo et al., manuscrit en préparation).

Différents supresseurs ont été identifiés et dès lors classifiés selon les gènes ciblés : il s'agit de ceux qui réduisent la réplication (*holC*, *oriC*, *dnaT-dnaC...*), ceux qui affectent le ratio ATP/ADP dans la cellule (*ynjD*, *fimD*, *atoS...*), ceux qui affectent également les ribonucléases (*rne*, *rnr*) et plusieurs autres dont la fonction n'a pas encore été élucidée. Ces mutations sont donc capables de restaurer le défaut de croissance dû à la combinaison des mutations des gènes *rnhA* et *topA*. Seuls les supresseurs qui affectent les ribonucléases, en particulier les mutations qui affectent la ribonucléase RNase E, seront utilisés dans cette étude.

1.5 La maturation et la dégradation des ARNs par les RNases

1.5.1 Généralités

Nombreux sont les mécanismes cellulaires qui ne peuvent être parfaitement compris sans une connaissance approfondie du métabolisme des ARNs. La synthèse protéique entre autre ne dépend pas seulement du niveau de messagers ARNs mais aussi d'autres types d'ARNs dont les ARNs de transfert (ARNt), ARNs ribosomiaux (ARNr) et ARN régulateurs (Arraiano et al., 2010). En effet, tous les ARNr et ARNt sont en premier lieu des molécules précurseurs qui subissent également une série de modifications, afin d'obtenir des molécules matures (Deutscher, 2009), qui joueront un rôle crucial dans le décodage du génome en protéines. Chez les procaryotes, l'analyse de la dégradation des ARNs est particulièrement laborieuse non pas à cause du couplage de la transcription avec la traduction et la dégradation des ARNs messagers, mais plutôt parce que la majorité de ces molécules d'ARNs messagers subissent un déclin rapide et exponentiel de 1.3 minutes à 37 °C en moyenne (Arraiano et al., 2010). Effectivement, les ARNms bactériens sont rapidement dégradés, ce qui permet aux bactéries de s'adapter aisément à de nouvelles conditions environnementales. Plusieurs paramètres influencent l'accessibilité aux sites de dégradation, il s'agit du degré de complexité de la structure de l'ARN (structure primaire, secondaire ou tertiaire), la présence de ribosomes ainsi que le processus de

polyadénylation⁹. Ainsi donc, les divers mécanismes de dégradation des ARNs représentent un facteur déterminant dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes (Arraiano et al., 2010).

1.5.2 Les RNases

Les RNases sont les enzymes qui interviennent dans la maturation, la dégradation et le contrôle de la qualité de tous les types d'ARNs. La plupart sont essentielles tandis que d'autres illustrent un chevauchement fonctionnel et sont donc interchangeables. Ces enzymes peuvent agir seul ou alors ils peuvent coopérer en formant des complexes de dégradation d'ARNs. Au cours de la dégradation, ceux-ci n'agissent pas seulement comme des 'molécules tueuses', éliminant tous les ARNs; en réalité, ils exercent leur action en fonction des besoins de croissance requis lors de l'adaptation à un nouvel environnement. De surcroît, ils jouent un rôle extrêmement important en contribuant au recyclage des ribonucléotides et aussi en éliminant les ARNs aberrants qui seraient à l'origine de la synthèse de protéines altérées (Arraiano et al., 2010). De cette façon, plusieurs facteurs peuvent être déterminants dans ce processus de régression : la séquence ou structure des ARNs pouvant agir comme éléments stabilisants ou déstabilisants à l'égard des RNases spécifiques; la présence de ribosomes lors de la traduction active peut dissimuler certains loci sur les molécules d'ARNs, ces derniers les rendant davantage vulnérables à l'action des RNases; l'addition d'une queue poly (A) qui s'expose comme un substrat majeur, augmente la susceptibilité des ARNs à l'action des exoribonucléases; puis les facteurs agissant en *trans* tels que la protéine Hfq qui est connue pour se lier aux ARNs régulateurs et affecter

⁹ Polyadenylation : processus qui fait partie des multiples voies de dégradation des ARNs chez les bactéries. En effet, elle est effectuée en majeure partie par la poly (A) polymérase I (PAPI), qui rajoute des résidus adenylate à l'extrémité 3', utilisant la molécule d'ATP comme donneur. Cette queue poly (A) déstabilise la molécule en favorisant sa dégradation par l'action d'exoribonucléases.

ainsi leur ‘turnover’, et d’autres à l’instar des hélicases qui en déroulant certaines structures d’ARNs révèlent les cibles des RNases (Arraiano et al., 2010).

Les RNases peuvent être classées en 2 catégories distinctes: les endoribonucléases qui clivent la molécule d’ARN en son sein (à l’intérieur) ou les exonucléases qui se caractérisent par un clivage au niveau d’une des 2 extrémités. Chez *Escherichia coli*, on distingue plus de 20 RNases différentes dont la plus critique semble être la RNase E (Arraiano et al., 2010).

1.5.3 L’endoribonucléase RNase E

La RNase E, enzyme encodée par le gène *rne*, a été tout d’abord identifiée par une mutation conditionnelle thermo-sensible (*rne-3071*) (Apirion & Lassar, 1978) puis a été initialement décrite comme activité requise pour la maturation de l’ARN ribosomal 9S d’*E. coli* (Ghora & Apirion, 1978). Cette enzyme qui est essentielle pour la croissance de la cellule, détient un rôle central dans le métabolisme des ARNs incluant la maturation des ARNs non-codants et la dégradation des messagers ARNs (Carpousis et al., 2009). De plus, les homologues de la RNase E ont été identifiés chez plus de 50 bactéries, archae et plantes (Lee & Cohen, 2003). Ainsi, la RNase E d’*E. coli* est une endoribonucléase qui clive d’une façon non spécifique les substrats simple-brins d’ARN, avec une préférence pour les séquences riches en bases A/U (adénine/uracile) (Mackie, 1992; McDowall et al., 1995).

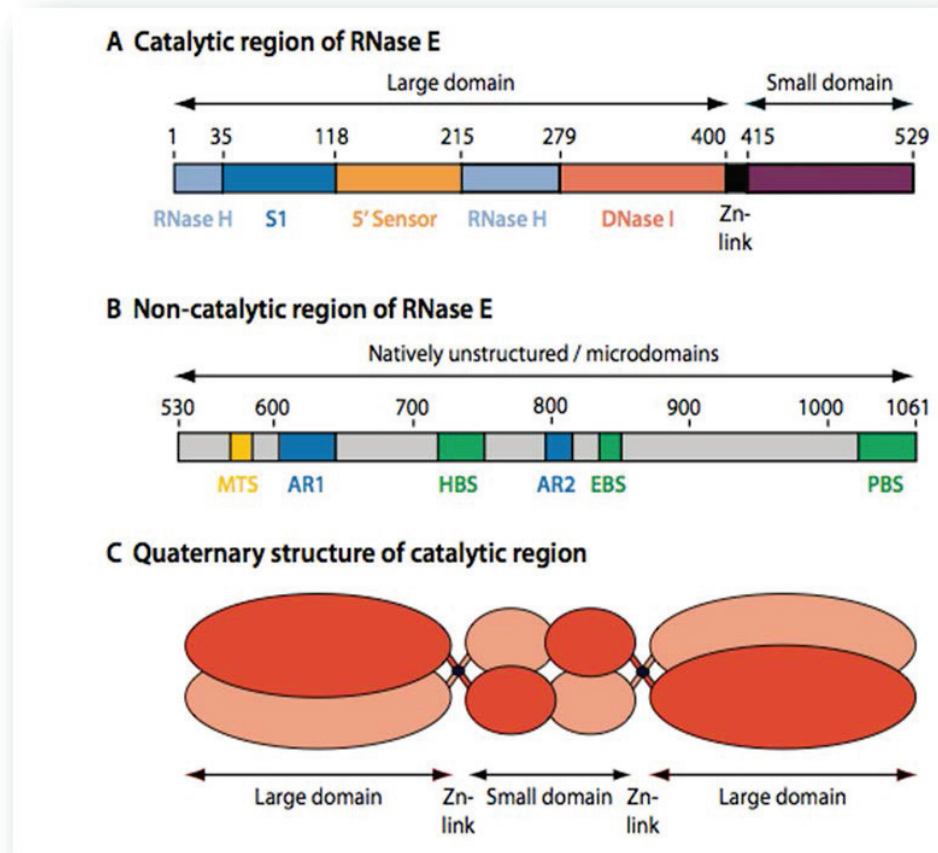


Figure 11 : Organisation et structure moléculaire de la RNase E (Bouvier & Carpousis, 2011).

A. Structure des domaines ('large' et 'petit') reliés par un lien zink, les 4 sous-domaines (RNase H, S1, 5'senseur et DNase I) de la région catalytique de la RNase E (résidus 1-529) impliqués dans la reconnaissance du substrat et de la catalyse.

B. Structure de la région non-catalytique (résidus 530-1061). Abréviation : MTS, séquence recrutant la membrane; AR1 et AR2, région 1 et 2 riches en arginine (respectivement); HBS, site de liaison à l'hélicase; EBS, site de liaison à l'énolase; PBS, site de liaison à la PNPase.

C. Structure quaternaire de la région catalytique (**A**). Les monomères (4) sont de couleur orange foncé/ orange clair pour la mise en évidence des interactions des domaines impliqués dans la formation de dimère et de tétramère. Figure adaptée avec permission de *John Wiley and Sons* de (Bouvier & Carpousis, 2011).

Cette large protéine de 1061 résidus est composée de deux régions fonctionnelles distinctes. Il s'agit en premier lieu de la portion amino-terminale qui représente le domaine catalytique (résidus 1-529), celle-ci est relativement conservée à travers les procaryotes (Marcaida et al., 2006). Ce domaine catalytique forme un homo-tétramère de près de 260 kDa de masse moléculaire et est organisé en dimères de dimères (Callaghan et al., 2005a). Chaque protomère étant composé de deux parties globulaires, les 'large et 'petit' domaines sont reliés entre eux par un lien zinc (Arraiano et al., 2010). Le domaine 'large' de la RNase E est constitué de 4 sous-domaines : le segment S1 qui permet la liaison à l'ARN et le senseur 5' qui reconnaît leur extrémité 5' mono-phosphorylé, ceux-ci interrompent le sous domaine (inactif) apparenté à la famille de l'endoribonucléase RNase H; puis, le segment DNase I qui coordonne l'ion magnésium nécessaire pour l'hydrolyse des ARNs. Les 'petits' domaines quant à eux, sont impliqués lors de la seconde interaction durant laquelle les 2 dimères s'associent pour former le noyau tétramérique catalytique de la RNase E (Bouvier & Carpousis, 2011) (Figure 11). En deuxième lieu, la portion carboxy-terminale représente pour sa part le domaine non catalytique (résidus 530-1061); celui-ci est en grande partie non structuré et peu conservé (Callaghan et al., 2004). Cette région non-catalytique contient une série de 'micro-domaines' qui sont impliqués dans des interactions avec d'autres protéines, la bicouche phospholipidique (membrane cytoplasmique) et le substrat ARN (Marcaida et al., 2006). Il est question ici d'un premier segment (MTS¹⁰) compris entre les résidus 565 et 582, responsable de la liaison de la RNase E avec la membrane interne cytoplasmique, d'un second (segment AR1¹¹) (résidus 604-644) qui est une région riche en arginine et enfin, les résidus 719 à 1061 qui forment la plate-forme où siègent les interactions entre la RNase E et les autres constituants majeurs du dégradosome (voir plus bas). Celle-ci, à son tour, est interrompue par une seconde région riche en arginine (AR2 résidus 796-814) (Bouvier & Carpousis, 2011) conformément à la figure 11.

¹⁰ MTS : *Membrane targeting sequence* (séquence ciblant la membrane).

¹¹ AR1 : *arginine-rich region 1* (région riche en arginine)

1.5.3.1 Les voies de clivage de la RNase E

D'autre part, il existe deux voies métaboliques de maturation des ARNs et de dégradation des messagers ARNms par l'endoribonucléase RNase E. En effet, il s'agit tout d'abord de la voie dépendante de l'extrémité 5', selon laquelle l'enzyme ARN pyrophosphohydrolase (RppH) convertit les transcrits primaires d'ARN 5' triphosphates en 5'monophosphate. Puis, au niveau de la RNase E, il s'ensuit une interaction entre le segment S1 de liaison à l'ARN, le sous-domaine apparenté à la RNase H et le 5'senseur, afin de former une sorte de poche qui va s'associer de façon exclusive avec l'extrémité 5' de la molécule d'ARN monophosphatée (cette poche ne pouvant être accommodée avec une extrémité 5' d'un transcrit triphosphaté). Toutes ces réactions vont contribuer à mieux positionner le substrat pour le clivage par le segment DNase I (Bouvier & Carpousis, 2011) (Figure 12.A). D'autre part, il a été observé que certains substrats pouvaient être clivés par la RNase E et ce, indépendamment de leur état de phosphorylation; autrement dit, même si leurs extrémités 5' formaient des structures secondaires ou étaient triphosphatées (Baker & Mackie, 2003; Hankins et al., 2007). Effectivement, il s'agit d'une autre voie métabolique subdivisée à son tour en deux mécanismes différents dont le premier nommé 'direct entry' ou 'voie directe' qui consiste en une reconnaissance initiale du substrat par la RNase E; il a été démontré que cette voie 'directe' implique certains éléments qui n'appartiendraient pas au domaine catalytique (portion amino-terminale) de la RNase E mais qui seraient plutôt localisés au niveau de sa portion carboxy-terminale (Bouvier & Carpousis, 2011). Le mécanisme de cette 'voie directe' et le rôle que jouent les éléments de la portion carboxy-terminale dans ce processus n'ont pas encore été clairement élucidés.

Tandis que le second nommé 'bypass' ou 'voie de contournement' se caractérise par une collaboration entre les endoribonucléases RNase III et RNase E (Figure 12.B). En fait, la RNase III a été à l'origine identifiée dans les extraits d'*E. coli* par Robertson *et al.* (1968) comme la première endoribonucléase spécifique aux ARNs double-brins (Arraiano et al., 2010). Les membres de la famille des RNases III sont largement distribués à travers les procaryotes et les eucaryotes, partageant des aspects fonctionnels et de structure

(Lamontagne et al., 2001). Concernant le mécanisme ‘*bypass*’, la RNase III crée une structure secondaire au sein de la molécule d’ARN 5’-triphosphatée où elle va effectuer un premier clivage, puis le transcrit 5’-monophosphaté d’ARN ainsi libéré sera pris en charge lors d’un second clivage par la RNase E (Arraiano et al., 2010).

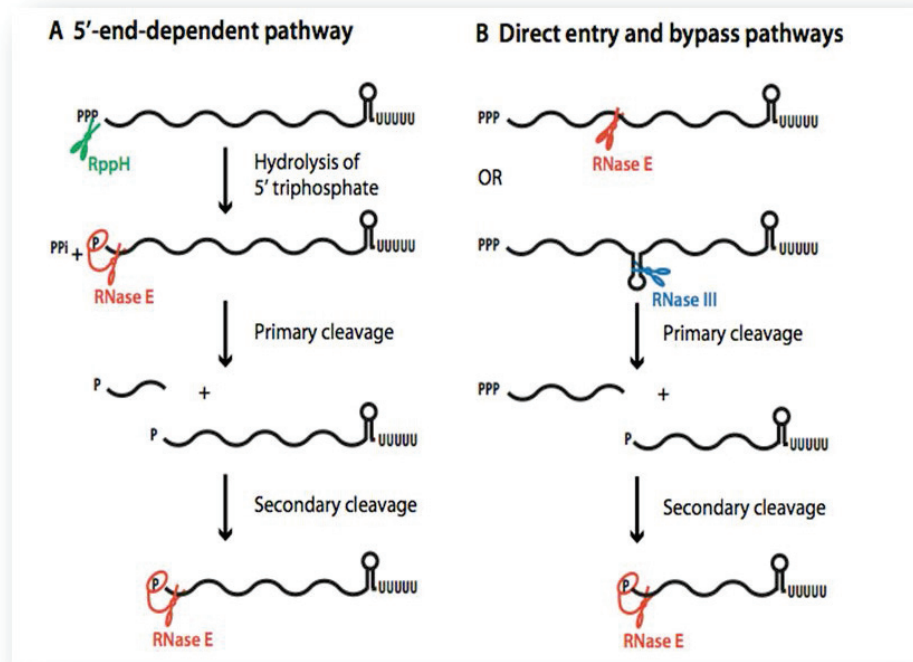


Figure 12: Différentes voies de clivage par la RNase E (Bouvier & Carpousis, 2011).

A. Voie dépendante de l'extrémité 5' à travers laquelle l'ARN pyrophosphohydrolase (RppH) hydrolyse le 5'triphosphate d'un transcrit primaire pour produire une molécule 5'monophosphatée. Les clivages primaires et secondaires sont 5'monophosphate stimulés.

B. Entrée directe et voies de contournement. Dans la voie directe, le clivage primaire par la RNase E est indépendant de l'extrémité 5'. Dans la voie de contournement l'endoribonucléase RNase III opère le clivage primaire. Le clivage secondaire par la RNase E étant 5'monophosphate stimulé. Figure adaptée avec permission de *John Wiley and Sons* de (Bouvier & Carpousis, 2011).

1.5.3.2 Les mutations synthétiques létales affectant l'activité de la RNase E

Il a été énoncé ci-dessus que la RNase E agit préférentiellement sur des ARNs ayant une extrémité 5'-monophosphorylée, celle-ci générée lorsque les transcrits primaires 5'-triphosphorylés sont catalysés par l'ARN pyrophosphohydrolase (RppH) (Bouvier & Carpousis, 2011). Cependant les souches n'exprimant pas cette protéine, c'est-à-dire les mutants $\Delta RppH$ sont des souches viables. Ces mutants n'ont pas la capacité d'emprunter la voie dite « dépendante de l'extrémité 5' » de clivage puisque celle-ci nécessite une activité conforme de la RppH et du 5'senseur qui module ici l'affinité de la RNase E pour les substrats monophosphorylés. Par ailleurs, la délétion de la portion carboxy-terminale n'est pas létale, cependant les mutants RNase E- ΔCTH ne sont pas en mesure d'utiliser la seconde voie de dégradation dite « directe » ou « indépendante de l'extrémité 5' » (Anupama et al., 2011). De cette façon, il a été démontré que la combinaison de ces deux mutations synthétiques RNase E- ΔCTH $\Delta RppH$ est létale, par contre ce n'est pas l'incapacité à former l'ARN dégradosome combinée avec la mutation $\Delta rppH$ qui serait à l'origine de cette incompatibilité. En effet, les souches $\Delta rppH$ demeurent viables même si les deux composants majeurs du dégradosome, la PNPase et la RhlB sont supprimés et ce individuellement ou simultanément (Anupama et al., 2011). En d'autres termes, la seconde voie de dégradation requiert la présence *in vivo* de la portion carboxy-terminale de la RNase E mais en aucun cas les autres composants du dégradosome tels que la PNPase et la RhlB. Cette létalité serait associée avec l'incapacité pour la RNase E d'emprunter l'une ou l'autre des deux voies de mécanisme de clivage des ARNs mais la viabilité de ces doubles mutants est rétablie grâce à des mutations compensatoires qui affecteraient le processus de terminaison Rho-dépendante de la transcription. Effectivement, des études ont démontré que les mutants *rho* ou *nusG* sont des supprimeurs géniques qui en présence de la ribonucléase RNase HI ou l'hélicase UvsW du phage T4 rétabliraient la viabilité du double mutant $\Delta RppH$ RNase E- ΔCTH . Ces supprimeurs sont caractérisés par une augmentation de l'apparition d'hybrides ARN-ADN dans la cellule (Gowrishankar & Harinarayanan, 2004; Harinarayanan & Gowrishankar, 2003). Ainsi, ce serait donc ces R-loops qui constitueraient une voie alternative de dégradation pour les substrats ARN qui ne peuvent

être pris en charge soit par la voie dite « dépendante de l'extrémité 5' » et la voie dite « directe » ou « indépendante de l'extrémité 5' » (K. Anupama et al., 2011).

1.5.3.3 La régulation de l'expression et de l'activité de la RNase E

Par ailleurs, le niveau cellulaire de la RNase E ainsi que son activité sont soumis à une régulation plutôt complexe. En effet, dans un premier temps, la concentration de l'enzyme dans la cellule est régulée par une boucle rétro-active au sein de laquelle la protéine d'intérêt, ici la RNase E, module la dégradation de son propre transcrit d'ARN dans le but de maintenir sa quantité dans un spectre assez étroit (Diwa et al., 2000; Jain & Belasco, 1995; Mudd & Higgins, 1993; Sousa, Marchand, & Dreyfus, 2001). Deuxièmement, l'efficacité de clivage de la RNase E dépend de la structure du substrat et de l'accessibilité des sites potentiels. Un substrat 5'-monophosphaté serait donc un activateur allostérique pour l'activité de la RNase E (Jiang & Belasco, 2004; Mackie, 1998). Ensuite, les interactions entre les ARN messagers considérés comme cibles avec la protéine Hfq et les ARNs régulateurs jouent un rôle important dans le clivage de certains ARNms par la RNase E (Wagner et al., 2002). Puis, l'activité de la RNase E est d'une façon globale affectée par des protéines inhibitrices à l'instar de la protéine ribosomale L4 et des protéines RraA et RraB (régulateurs de l'activité RNase A et B, respectivement) qui interagissent avec la RNase E et inhibe le clivage d'un groupe distinct de transcrits par la protéine (Gao et al., 2006; Lee et al., 2003). Enfin, la localisation membranaire de la RNase E ainsi que son association avec le cytosquelette bactérien pourrait affecter sa fonction à travers de nombreux mécanismes (Khemici et al., 2008; Taghbalout & Rothfield, 2008).

1.6 Le complexe multi-protéique : l'ARN dégradosome

1.6.1 Généralités

Tel que mentionné ci-dessus, la région carboxy-terminale de la RNase E est une plateforme où siègent les interactions entre celle-ci et les constituants majeurs du dégradosome (Bouvier & Carpousis, 2011). En effet, le dégradosome est un large complexe multi-protéique qui est impliqué dans la dégradation des ARNs (Arraiano et al., 2010). Chez la bactérie *E. coli*, ce complexe multi-protéique a été découvert suite à des efforts faits en vue de purifier et caractériser la RNase E (Miczak et al., 1996; Py et al., 1994; Py et al., 1996). La formation de ce complexe contribue à la coordination du clivage endo-ribonucléolytique avec la dégradation exo-ribonucléolytique (Miczak et al., 1996; Py et al., 1994). En effet, ce complexe multiprotéique est composé majoritairement d'enzymes de dégradation telles que la RNase E, la polynucléotide phosphorylase (PNPase) avec son activité d'exonucléase 3' vers 5', puis de l'enzyme glycolytique enolase et enfin de l'hélicase ARN ATP-dépendante (RhlB) (Miczak et al., 1996; Py et al., 1994; Vanzo et al., 1998). Par ailleurs, plusieurs autres complexes s'apparentant à celui du dégradosome ont été identifiés chez les eucaryotes. Un homologue de la PNPase se trouve à faire partie du complexe multi-protéique impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du chloroplaste (Hayes et al., 1996). En outre, le complexe mtEXO et l'exosome qui sont impliqués dans la maturation et la dégradation des ARNs, sont deux autres complexes décrits chez les levures et leurs mitochondries (Margossian et al., 1996; Mitchell et al., 1997). Ainsi, l'identification des complexes multi-protéique chez les bactéries, les plantes et les levures suggère que l'assemblage des ribonucléases avec d'autres enzymes comme les hélicases ARN pourrait être un procédé commun dans la maturation et la dégradation des ARNs (Vanzo et al., 1998).

1.6.2 La polynucléotide phosphorylase : PNPase

La polynucléotide phosphorylase (PNPase) est une exo-nucléase qui est spécifique aux substrats simple-brins. Elle est membre de la famille des RNases PH, celles-ci sont des enzymes dégradant l'ARN selon l'orientation 3'→5' (Deutscher & Li, 2001; Symmons et al., 2002). Cette enzyme qui a été initialement découverte chez la souche *Azotobacter vinelandii* par Grunberg-Manago *et al.* en 1955 (Grunberg-Manago et al., 1955), est largement conservée, étant retrouvée chez les bactéries, les plantes et les métazoaires (Bermudez-Cruz et al., 2005; Zuo & Deutscher, 2001). Cette exoribonucléase qui interagit avec la région carboxy-terminale de la RNase E entre les résidus 1021 et 1061, est encodée par le gène *pnp*, celui-ci étant sous le contrôle de deux promoteurs (Portier & Regnier, 1984). L'expression du gène *pnp* est négativement auto-régulée au niveau post-transcriptionnel par l'action conjointe des enzymes PNPase et RNase III (Robert-Le Meur & Portier, 1992, 1994). Les niveaux cellulaires de l'enzyme PNPase sont également affectés par la poly-adénylation. En effet, il a été suggéré que les transcrits polyadénylés titrent la quantité d'enzyme de polynucléotide phosphorylase disponible afin de réaliser l'autorégulation normale (Mohanty & Kushner, 2002).

1.6.3 L'hélicase RhlB

Quant à l'autre composant majeur du dégradosome, il s'agit ici de l'hélicase ARN encodée par le gène *rhlB*. Ce gène est localisé à la 85^e minute du chromosome chez la souche *E. coli* (Kalman et al., 1991). Ainsi, la protéine RhlB est un membre de la famille DEAD-box¹² des hélicases d'ARN ATP-dépendantes, que l'on retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Kalman et al., 1991; Schmid & Linder, 1992). Celle-ci interagit avec la région carboxy-terminale de la RNase E au niveau des résidus 719 à 731. En réalité, le dégradosome possède une activité dépendante de l'ATP qui facilite la dégradation

¹² Les protéines DEAD-box se caractérisent par un motif contenant la séquence d'acides aminés Asp-Glu-Ala-Asp = acide aspartique-acide glutamique-alanine-acide aspartique.

d'ARNs structurés et ce par la polynucléotide phosphorylase. Effectivement, tel que mentionné ci-dessus, la PNPase est une exoribonucléase qui dégrade l'ARN avec processivité selon l'orientation 3' à 5'. Toutefois, cette activité peut faire face à certains obstacles tels que les structures secondaires (tige-boucle) au sein de la molécule d'ARN (Causton et al., 1994). De ce fait, l'action de la RhlB au niveau du dégradosome serait de défaire ces structures secondaires en vue de faciliter la dégradation par la PNPase (Py et al., 1996).

1.6.4 L'enzyme glycolytique : l'énolase

Enfin, chez de nombreuses espèces bactériennes, notamment chez la bactérie *E. coli*, on retrouve l'enzyme de la glycolyse émolase, qui représente le dernier composant majeur du dégradosome. Cette enzyme glycolytique est recrutée pour former le complexe multi-enzymatique au niveau de la région carboxy-terminale de la RNase E, tout comme les deux autres composants majeurs la PNPase et la RhlB (Nurmohamed et al., 2010). En effet, chez *E. coli*, environ un dixième du volume total de l'enzyme émolase interagit avec la RNase E au niveau des résidus 834 à 850 (Carpousis, 2007). Cette enzyme qui est universellement conservée chez les organismes vivants, catalyse la réaction de déshydratation de la 2-phospho-glycerate-D pour former la phospho-énol-pyruvate et la réaction inverse dans la néo-glucogénèse (Spring & Wold, 1971). Cependant, son rôle principal au sein du dégradosome demeure non élucidé.

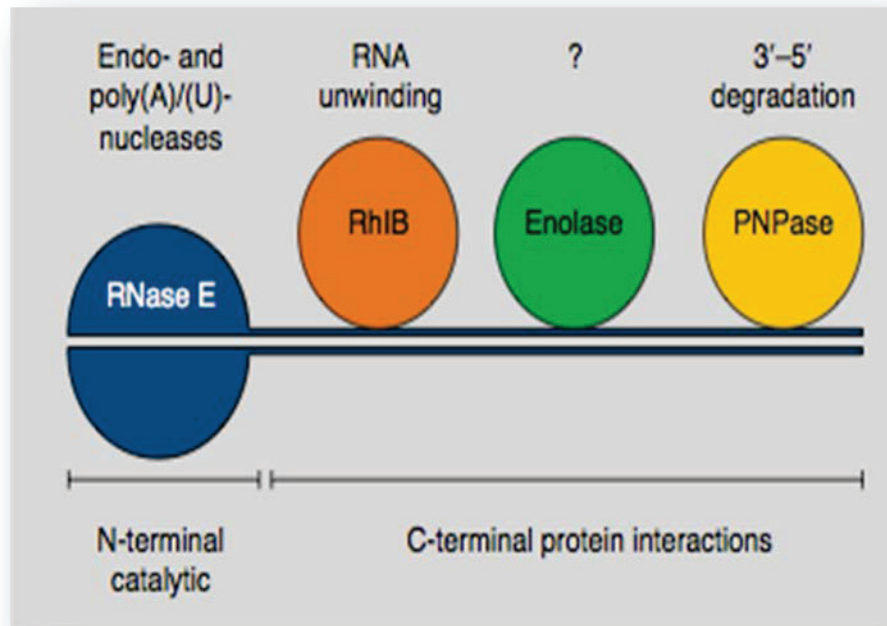


Figure 13: Diagramme représentatif du dégradosome ARN chez *E. coli* (Carpousis, Vanzo, & Raynal, 1999).

Composantes intégrales du dégradosome de la bactérie *E. Coli* : composition multidomaines de la RNase E (bleu) avec une longue moitié C-terminale qui sert d'échafaud pour l'interaction avec les autres composants majeurs à l'instar de l'hélicase 'RhlB' (orange), la polynucléotide phosphorylase 'PNPase' (jaune) et l'énolase (vert). Figure adaptée avec permission d'*Elsevier* de (Carpousis et al., 1999)

Il existe également un groupe de constituants mineurs qui interagit avec le dégradosome afin d'affecter sa composition et de moduler son activité catalytique. Il s'agit donc entre autre de l'enzyme polyphosphate kinase, la poly (A) polymérase, des protéines ribosomales ainsi que les protéines chaperonnes DnaK et GroEL (Butland et al., 2005; Miczak et al., 1996; Morita et al., 2005; Regonesi et al., 2006).

1.7 Objectifs

La RNase E est un complexe protéique remarquable contenant un domaine catalytique amino-terminal, un domaine central donnant lieu à des sites de liaison avec l'ARN et les multiples sites de liaison au niveau de la région carboxy-terminale où interagissent les autres composants majeurs du dégradosome (Vanzo et al., 1998). Mon projet vise à caractériser les supresseurs extragéniques provenant de l'insertion du transposon Tn5 dans les régions amino et carboxy- terminales de la RNase E et ce selon différentes conditions expérimentales. Il est connu que la RNase HI joue un rôle important dans la régulation du surenroulement en modulant l'activité de la gyrase ainsi que dans le métabolisme des hybrides ADN/ARN (R-loop). Sachant que la RNase HI est une endoribonucléase tout comme la RNase E, mon hypothèse suggère un chevauchement fonctionnel entre les endoribonucléases RNase HI et RNase E lors de la maturation des ARNms et du métabolisme des R-loops qui serait requis lors de l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales. Mon objectif sera donc de déterminer si la RNase E peut parfois remplacer la RNase HI, par exemple, en réduisant la réplication de type cSDR initiée aux R-loops.

2. Matériels et Méthodes

Tableau 2 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées dans cette étude

Souches	Génotype	Source ou référence
RFM475	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , Δ <i>lac74</i> , <i>gyrB221</i> (CouR), <i>gyrB203</i> (Ts), Δ (<i>topA</i> <i>cysB</i>)204	Drolet <i>et al.</i> (1995)
RFM430	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>AtrpE</i>	Drolet <i>et al.</i>
VU22	RFM475, <i>rnhA::cam</i> pPH1243	V. Usongo
VU23	RFM430, <i>rnhA::cam</i>	V. Usongo
VU29	SB263:RFM443, Δ (<i>srlrecA</i>)306::Tn10	V. Usongo
VU31	RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>gyrB</i> (Ts) pPH1243	V. Usongo
VU90	RFM430, <i>rnhA::cam</i> pBR322	V. Usongo
VU92	RFM430 pBR322	V. Usongo
VU93	RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>gyrB</i> (Ts) pBR322	V. Usongo
VU97	RFM430, <i>gyrB</i> (Ts) pBR322	V. Usongo
MD48	MC4100, <i>dnaA46</i> (Ts) <i>tna::Tn10</i>	Hansen and von Meyenburg, 1979)
MD49	AQ8107: <i>sfiA::lacZ</i>	Huisman <i>et al.</i> (1981)
ENS134	BL21 (DE3), Plac-T7 RNA polymérase, PT7-lacZ	Lopez <i>et al.</i> (1994)
ENS134-10	ENS134, <i>zce-726::Tn10</i> , <i>rne</i> Δ 10 (aa Δ 844-1045)	Leroy <i>et al.</i> (2002)
ENS134-14	ENS134, <i>zce-726::Tn10</i> , <i>rne</i> Δ 14 (aa Δ 636-845)	Leroy <i>et al.</i> (2002)
JE1	MD48, <i>rnhA::cam</i>	Ce travail
JE6	MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 867)	Ce travail
JE16	MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 997)	Ce travail
JE29	MD49, <i>rnhA::cam</i>	Ce travail
JE36	MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 883)	Ce travail
JE40	MD49, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 867)	Ce travail
JE44	MD49, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 997)	Ce travail
JE54	RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 883) pBR322	Ce travail
JE58	RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 500) pBR322	Ce travail
JE60	MD49, <i>rne::Tn5</i> (aa 867)	Ce travail

JE62	MD49, <i>rne::Tn5</i> (aa 997)	Ce travail
JE63	MD48, <i>rnhA::cam, rne::Tn5</i> (aa 500)	Ce travail
JE64	MD49, <i>rnhA::cam, rne::Tn5</i> (aa 500)	Ce travail
JE66	MD49, <i>rnha::cam, rne::Tn5</i> (aa 883)	Ce travail
JE76	MD49, <i>rne::Tn5</i> (aa 500)	Ce travail
JE78	MD49, <i>rne::Tn5</i> (aa 883)	Ce travail
JE80	ENS134, <i>rne::Tn5</i> (aa 500)	Ce travail
JE82	ENS134, <i>rne::Tn5</i> (aa 997)	Ce travail
JE84	ENS134, <i>rne::Tn5</i> (aa 867)	Ce travail
JE86	ENS134, <i>rne::Tn5</i> (aa 883)	Ce travail
JE101	MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 997)	Ce travail
JE103	MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 500)	Ce travail
JE107	MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 867)	Ce travail
JE119	MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 883)	Ce travail
JE130	RFM430, <i>rnhA::cam, rne::Tn5</i> (aa 867) pBR322	Ce travail
JE131	RFM430, <i>rnhA::cam, rne::Tn5</i> (aa 997) pBR322	Ce travail
JE132	RFM430, $\Delta(srl-recA)306::Tn10$ pBR322	Ce travail
JE133	RFM430, <i>rnhA::cam, \Delta(srl-recA)306::Tn10</i>	Ce travail

Plasmides utilisés : pPH1243 est un dérivé du plasmide pTrc99a qui code pour le gène *topB*, sous le contrôle du promoteur *Ptrc* inductible à l'IPTG (Broccoli et al., 2000). pBR322 contient les gènes de résistances *amp^R* et *tet^R* (Bolivar et al., 1977).

Milieux de culture utilisés :

❖ Milieu riche LB (1L) :

(Pour milieu solide, rajouter 15 g d'agar)

- 10g tryptone,
- 5g extrait de levure,
- 5g NaCl

❖ Milieu pauvre M9 (1L) :

(Pour milieu solide, rajouter 15 g d'agar)

- 5X sels M9 (64g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g KH_2PO_4 , 2,5g NaCl, 5g NH_4Cl);
- (2ml) 1M MgSO_4
- (100 μl) 1M CaCl_2
- (20 ml) 20% glucose/glycérol.

❖ Milieu VB Casa Kogoma (VBCK) (1L)

(Pour milieu solide, rajouter 15 g d'agar)

- 20ml sels VB 50X
- 10ml glucose 20%
- 5ml casamino acids 20%
- 5ml thiamine 0.1%
- 10ml thymine 0.1 %
- 10ml cystéine 0.5%
- 10ml kogoma mix

❖ Sels VB 50X (0.5L)

- 5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 50g Acide citrique
- 250g K_2HPO_4
- 87,5g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

❖ Kogoma Mix (100ml)

- | | |
|-----------------|------------------|
| 0,5g proline | 0,5g tryptophane |
| 0,5g valine | 0,5g histidine |
| 0,5g isoleucine | 0,5g méthionine |

2.1 Extraction d'ADN pour analyse de topoisomères plasmidiques.

a) Construction des souches à l'étude : Les souches d'*Escherichia coli* utilisées dans cette expérience sont dérivées de la souche RFM430. Il s'agit de VU92 (RFM430, pBR322), VU90 (RFM430, *rnhA::cam* pBR322), VU97 (RFM430, *gyrB*(Ts) pBR322) et VU93 (RFM430, *rnhA::cam*, *gyrB*(Ts) pBR322) et VU31 (RFM430, *rnhA::cam*, *gyrB*(Ts) pPH1243). La souche triple mutante VU22 (RFM475, *rnhA::cam* pPH1243) est dérivée de RFM475. Ces souches ont été construites par transduction avec le phage P1 *vir* tel que décrit (Miller, 1992). Afin de maintenir la sélection des plasmides pBR322 pour les souches VU90, 92, 93 et 97 lors de la croissance et pPH1243 pour les souches VU22 et 31, on ajoute au milieu de culture de l'antibiotique ampicilline ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Pour la croissance des souches dérivées de RFM475 en plus de l'ampicilline, on ajoute de la cystéine (0.05 %) en raison de la délétion partielle du gène *cysB* résultant de la délétion du gène *topA*.

b) Extraction de plasmides pour analyse du surenroulement : La croissance de nuit (« *overnight* ») des souches à l'étude se fait à 37°C sur milieu solide LB supplémenté de l'antibiotique ampicilline ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) pour celles dérivées de RFM430 et en plus de l'antibiotique, de la cystéine (0.05 %) pour celles dérivées de RFM475. Ces souches seront diluées dans un volume de 50 ml de milieu de culture LB préchauffé à 37°C afin d'avoir une densité optique de départ de 0,03. La croissance se fait dans un bain-marie à eau afin d'amener les souches en début de phase logarithmique, et d'obtenir ainsi une densité optique ($D.O_{600\text{nm}}$) d'environ 0,6. Une fois cette D.O. atteinte, on divise le milieu de culture en deux volumes similaires et dans un des deux on rajoute l'antibiotique spectinomycine ($400 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) puis on procède à l'extraction plasmidique au temps indiqué. Ensuite, on transfère les milieux de culture dans un bain-marie à 28°C de température et on continue l'extraction plasmidique aux temps indiqués selon la méthode par lyse alcaline tel que décrit (Ausubel, 1994). La croissance des souches est interrompue après ajout d'un volume de 20 ml du bouillon de culture dans un tube contenant de la glace. En effet, cette

procédure fait chuter immédiatement la température de la culture à 0°C avant de procéder à l'extraction.

c) Analyse des topoisomères du plasmide extrait: Tout d'abord, la quantification des plasmides pBR322 et pPH1243 extraits se fait par migration du produit d'extraction préalablement mis en suspension dans une solution de TE-RNase A (20 µg.ml⁻¹ RNase A) sur gel d'agarose d'électrophorèse (0,8 %) avec du Tris-Borate - EDTA (0.5X). Par la suite, l'analyse des topoisomères s'effectue à partir d'un gel d'électrophorèse mis en présence de la chloroquine (7,5 µg.ml⁻¹) avec du Tris-Borate - EDTA (0.5X). Après électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium puis photographié sous une lumière U.V. Puis, il est séché et préparé pour l'hybridation *in situ* avec une sonde marquée au radio-isotope ³²P correspondant au gène *bla* des plasmides pBR322 et pPH1243. Les oligonucléotides correspondants à la séquence *blaf* 5'CTGCAGGCATCGTGGTG 3' et *blar* 5' GGGCCTCGTGATACGCC 3' ont été utilisés dans une réaction PCR pour obtenir un fragment d'ADN correspondant au gène *bla*. La densité des bandes des topoisomères est quantifiée à partir du Phosphoimager Typhoon 9400 avec le logiciel Imagequant version 5.2 (Amersham Biosciences).

2.2 Cytométrie en flux

a) Construction des souches à l'étude: La construction des souches JE130 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 867) pBR322), JE131 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 997) pBR322), JE54 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 883) pBR322) et JE58 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 500) pBR322) a été effectuée par transduction avec le phage P1 *vir*. Les différents lysats phagiques proviennent de souches portant les suppresseurs extragéniques à l'étude, la souche receveuse étant VU90 (RFM430, *rnhA::cam* pBR322). La technique par PCR a été utilisée pour confirmer la présence du transposon Tn5 (≅ 950

pb) à partir des oligonucléotides pRL27-1 5' CGGAAACGTCTTGCTCG 3' et Tn5-2 5' CGTTGTCGGGAAGATGCG 3'. Les géloses de sélection en milieu LB contiennent les antibiotiques chloramphénicol (10 µg.ml⁻¹), kanamycine (50 µg.ml⁻¹) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). Ensuite, une autre transduction avec le phage P1 *vir* impliquant la souche donneuse VU29 (SB263:RFM443, $\Delta(srl-recA)306::Tn10$) et une souche receveuse VU23 (RFM430, *rnhA::cam*) a été effectuée. La technique par PCR est utilisée pour confirmer l'absence du gène *recA* (\cong 900 pb) chez les clones résistants à la tétracycline à partir des oligonucléotides 5'*recA* 5'GCACTGGGCCAGATTGAG 3' et 3'*recA* 5' GCTCAGCAGCAACTCACG 3'. Les géloses de sélection contiennent du milieu VB Casa kogoma, du chloramphénicol (10 µg.ml⁻¹), de la tétracycline (10 µg.ml⁻¹) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). Le contrôle négatif étant VU 29 et le contrôle positif VU92 (souche sauvage). Étant donné que la confirmation est négative, il faut en même temps procéder à l'amplification de la cassette *rnhA::cam* (> 1517 pb) à partir des oligonucléotides SB17 5' GTCAGAATTCCAGGAAGTCTACCAGA 3' et SB18 5' GTCAAAGCTTGGCAATGTCGTAAACC 3' afin d'attester le bon fonctionnement du PCR.

b) Cytométrie en flux : La croissance des souches a été faite « *overnight* » à 37°C sur milieu solide M9 additionné de tryptophane, glucose et de casamino acides (0,02 %). Ces cultures O/N sont ensuite diluées dans un milieu de culture liquide M9 supplémenté par les mêmes éléments nutritifs afin d'obtenir une D.O_{600nm} de 0,05 de départ pour une croissance à 37°C jusqu'à une D.O_{600nm} de 0,3. Lorsque la D.O désirée est obtenue, la rifampicine (300 µg.ml⁻¹) est ajoutée afin d'empêcher le déclenchement de nouveaux cycle de réplication, puis les cellules sont traitées pendant deux heures. Ce délai permettra aux rondes de réplication déjà amorcées de s'achever complètement. Les cellules sont lavées deux fois dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) avant d'être fixé avec de l'éthanol (77%). Après un lavage avec du tampon TE, les cellules sont colorées avec du Sytox (10

µM) pendant 15 minutes (Sytox[®] Green nucleic acid stain, molecular probes[®], life technologies[™]). La cytométrie en flux est réalisée sur un FACScalibur Becton Dickinson.

2.3 Mesure de l'habileté de différentes souches à former des colonies sur milieu solide (*Efficiency of Plating* : EOP)

a) Construction des souches à l'étude : La souche de départ utilisée est MD48 (MC4100, *dnaA46* (Ts) *tna* ::Tn10), elle est thermosensible et ne devrait pas pousser à une température de 42°C. Elle sert de souche receveuse dans la transduction avec le phage P1 *vir*, pour donneur VU23 (RFM430, *rnhA*::*cam*). A noter que toutes les transductions issues de cette souche ont été faites avec le phage P1 *vir*. Il s'agit de la souche JE1 (MD48, *rnhA*::*cam*), dont les transductants seront sélectionnés sur géloses LB contenant les antibiotiques tétracycline (10 µg.ml⁻¹), du chloramphénicol (10 µg.ml⁻¹) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). L'insertion de la cassette *rnhA*::*cam* a été confirmée par technique de PCR à l'aide des oligonucléotides SB17 et SB18. Par la suite, les souches JE6 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 867)), JE16 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 997)), JE36 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 883)) et JE63 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 500)) ont été construites par transduction et la sélection a été réalisée sur gélose LB contenant les antibiotiques tétracycline (10 µg.ml⁻¹), chloramphénicol (10 µg.ml⁻¹), de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). Enfin, les souches JE101 (MD48, *rne*::Tn5 (aa 997)), JE103 (MD48, *rne*::Tn5 (aa 500)), JE107 (MD48, *rne*::Tn5 (aa 867)) et JE119 (MD48, *rne*::Tn5 (aa 883)) ont été construites par transduction et la sélection a été réalisée sur gélose LB contenant les antibiotiques tétracycline (10 µg.ml⁻¹), de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). L'insertion du transposon Tn5 a été confirmée par technique de PCR à l'aide des oligonucléotides PRL27-1 et TN5-2.

b) Technique d'EOP (« *Efficiency Of Plating* ») : La croissance des souches a été faite « *overnight* » à 30°C sur un milieu solide LB supplémenté des antibiotiques ayant servis à

la sélection lors des différentes transductions. Ces cultures O/N ont été diluées en milieu LB plus les antibiotiques requis, afin d'obtenir une $D.O_{600nm}$ de 0,03 de départ pour une croissance à 30°C jusqu'à une $D.O_{600nm}$ située entre 0,6 et 0,7. Une fois la D.O désirée obtenue, des dilutions sériées de 10^0 à 10^{-7} ont été faites, puis de celles-ci, a été étalé en duplicata à l'aide de billes stériles un volume de 100 μ l de chaque dilution sur gélose LB puis l'incubation a été réalisée à 30°C et 42°C. Un décompte du nombre de colonies obtenu sur chaque gélose après 24h et 48h de croissance selon la dilution et la température a été fait puis le taux de survie a été estimé selon la formule suivante : $\text{Nbre d'UFC.ml}^{-1} (42^\circ\text{C}) / \text{Nbre d'UFC.ml}^{-1} (30^\circ\text{C})$.

$\text{UFC.ml}^{-1} = \text{Nombre de colonies} \times \text{réciproque de dilution étalée} \times 1/\text{volume étalé.}$
--

2.4 Stries quantitatives sur milieu solide.

a) Stries quantitatives: Les souches à l'étude sont MD48, JE1, JE6, JE16, JE36 et JE63. La croissance de celles-ci a été faite « *overnight* » à 30°C sur milieu solide pauvre M9 supplémenté de glucose (0,4 %), tryptophane (0,05 %) et casamino acides (0,02 %). Ces cultures O/N ont été diluées en milieu liquide pauvre M9 additionné des mêmes éléments nutritifs précédents afin d'obtenir une $D.O_{600nm}$ de 0,05 de départ pour une croissance à 30°C jusqu'à une $D.O_{600nm}$ de 0,6. Par la suite, une fois la D.O désirée obtenue, 20 μ l de chacune des croissances a été récupéré et strié sur gélose M9 additionné des mêmes éléments précédents et incubé à 42°C. Les croissances sur stries ont été observées et comparées après 48h et 72 h de croissance.

2.5 Mesure de l'induction de la réponse SOS en déterminant le niveau d'expression du gène *sfiA* fusionné à *lacZ*.

a) Construction des souches à l'étude : La souche de départ utilisée est MD49 (AQ8107: *sfiA::lacZ*), elle a été construite par fusion du promoteur du gène *sfiA* avec le gène rapporteur codant pour la β -galactosidase. Elle sert de souche receveuse dans la transduction avec le phage P1 *vir* avec pour donneur, une souche VU23 (RFM430, *rnhA::cam*). A noter que toutes les transductions issues de cette souche ont été faites avec le phage P1 *vir*. Il s'agit de la souche JE29 (MD49, *rnhA::cam*), dont les transductants seront sélectionnés sur géloses LB, chloramphénicol ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). L'insertion de la cassette *rnhA::cam* a été confirmée par la technique de PCR à l'aide des oligonucléotides SB17 et SB18. Par la suite, les souches JE40 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 867)), JE44 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 997)), JE64 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 500)) et JE66 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 883)) ont été construites par transduction et la sélection a été réalisée sur gélose LB contenant les antibiotiques chloramphénicol ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamycine ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). Enfin, les souches JE60 (MD49, *rne::Tn5* (aa 867)), JE62 (MD49, *rne::Tn5* (aa 997)), JE76 (MD49, *rne::Tn5* (aa 500)) et JE78 (MD49, *rne::Tn5* (aa 883)) ont été construites par transduction et la sélection a été réalisée sur gélose LB contenant l'antibiotique kanamycine ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et du Na-citrate pH 5.5 (0,02 M). L'insertion du transposon Tn5 a été confirmée par technique de PCR à l'aide des oligonucléotides PRL27-1 et TN5-2.

b) Technique de dosage de la β -galactosidase pour mesurer l'induction de la réponse SOS :

Il s'agit tout d'abord d'obtenir une croissance O/N à 37°C des différentes souches à l'étude sur milieu solide VB Casa Kogoma (VBCK) additionné des antibiotiques ayant servis à la sélection. Ces cultures O/N ont été diluées en milieu liquide riche LB contenant les mêmes antibiotiques ayant servis lors des O/N, afin d'obtenir une D.O_{600nm} de 0,03 de départ, pour

une croissance à 37°C jusqu'à une D.O_{600nm} de 0,6. Par la suite, une fois la D.O désirée obtenue, le dosage de la β-galactosidase a été fait en duplicata (100 µl et 200 µl de lysat) tel que décrit (Miller, 1992) et selon la formule :

$$\text{Unité } \beta\text{-gal} = 1000 \frac{(D.O_{420nm} - 1.75 * D.O_{550nm})}{\text{Tps (min)} * \text{Vol lysat (ml)} * D.O_{600nm}}$$

2.6 Mesure de l'activité RNase E des différents mutants *rne* en dosant la β-galactosidase d'une fusion T7-*lacZ*.

a) Construction des souches à l'étude : La souche de départ utilisée est ENS134 (BL21 (DE3), Plac-T7 RNA polymérase, PT7-*lacZ*) (Lopez et al., 1994), elle a été construite de la façon suivante. Le gène endogène *lacZ* a été éliminé mais la souche code toujours pour le répresseur *lac* LacI. Plusieurs éléments ont été insérés dans le chromosome : le *gene* *l* codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7, sous le contrôle du promoteur *lac* (P_{lac}) et un gène hybride *lacZ* sous le contrôle du promoteur T7 (P_{T7}). Le gène *lacZ* est suivi d'une petite région de l'extrémité 5' du gène rapporteur ARNt *lacY* et d'un terminateur de transcription (Ter). L'ARN T7-*lacZ* est très sensible à la dégradation par la RNase E, codée par le gène *rne* (figure 17). Ceci est dû au fait que la transcription très rapide par la polymérase T7 cause un découplage transcription traduction ce qui expose l'ARN à la dégradation par la RNase E.

Ainsi donc, à partir de la souche ENS134 et de plusieurs transductions avec le phage P1 *vir*, ont été construites les souches JE80 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 500)), JE82 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 997)), JE84 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 867)) et JE86 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 883)). La sélection des transductants a été faite sur gélose LB contenant les antibiotiques

tétracycline ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamycine ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et du Na-citrate pH 5.5 ($0,02 \text{ M}$). L'insertion du transposon Tn5 a été confirmée par technique PCR à l'aide des oligonucléotides PRL27-1 et TN5-2. Les autres souches utilisées lors de cette étude étaient ENS134-10 (ENS134, *zce-726::Tn10*, *rneΔ10* (aa Δ844-1045)) (Leroy et al., 2002) et ENS134-14 (ENS134, *zce-726::Tn10*, *rneΔ14* (aa Δ636-845)) (Leroy et al., 2002).

b) Technique de dosage de la β-galactosidase pour mesurer le niveau de dégradation de l'ARN T7-lacZ par la RNase E : Il s'agit tout d'abord d'obtenir une croissance O/N à 30°C des différentes souches à l'étude sur milieu solide pauvre M9 supplémenté de glycérol (0,4 %) et des casamino acides (0,02 %) et des antibiotiques ayant servis à la sélection. Ces cultures O/N ont été diluées en milieu liquide pauvre M9 additionné d'IPTG ($100 \mu\text{M}$), de glycérol (0,4 %) et des casamino acides (0,02 %) et des mêmes antibiotiques ayant servis lors des O/N, afin d'obtenir une $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ de 0,02 de départ pour une croissance à 30°C jusqu'à une $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ de 0,3. Par la suite, une fois la D.O désirée obtenue, le dosage de la β-galactosidase a été fait en duplicata ($25 \mu\text{l}$ de lysat) tel que décrit (Miller, 1992) et selon la formule (voir, ci-dessus)

2.7 Expérience de Southern blotting pour mesurer le ratio *oriC*/*Ter* chez différentes souches à l'étude

a) Construction des souches à l'étude : Ce sont les mêmes utilisées lors de l'expérience de cytométrie en flux c'est-à-dire VU90, VU92, JE132 (RFM430, $\Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10}$ pBR322), JE133 (RFM430, *rnhA::cam*, $\Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10}$), JE130, JE131, JE54, JE58.

b) Extraction d'ADN génomique : Une croissance O/N a été obtenue sur milieu solide riche LB et pauvre M9 supplémenté de tryptophane (0,05 %). Ces cultures O/N ont été diluées en

milieu liquide riche LB (plus antibiotiques correspondants) et en milieu pauvre M9 additionné de tryptophane (plus antibiotiques correspondants) afin d'obtenir une D.O_{600nm} de 0,03 de départ pour une croissance à 37°C jusqu'à une D.O_{600nm} de 0,6. Par la suite, les cellules ont été récupérées pour l'extraction génomique selon la méthode au phénol-chloroforme–isoamyl-alcohol 25:24:1 précédemment décrite (Ausubel, 1994). La quantification des extraits a été faite sur gel d'agarose 0.8% suivie de la digestion enzymatique pendant 6h à 37°C par l'enzyme de restriction XmnI ayant comme site de reconnaissance 5' ... GAANN•NNTTC... 3' et son complémentaire 3' ...CTTNN•NNAAG... 5'.

c) Hybridation du gel et transfert sur membrane : La vérification des échantillons digérés a été faite sur gel d'agarose 2%, pendant une migration de 24h avec du Tris-Borate-EDTA (0,5X) puis coloration au bromure d'éthidium. Ensuite, il a fallu couper le gel en fonction d'une échelle de marqueur de poids moléculaire appropriée (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas life sciences) afin d'obtenir les bandes ciblées c'est-à-dire bande OriC \cong 7000 pb et la bande Ter \cong 4000 pb. Le transfert a été fait sur une membrane de nitrocellulose (membrane Hybond-N optimisée pour transfert d'acides nucléiques, Amersham Biosciences). La technique de Southern blotting utilisée a été précédemment décrite (Ausubel, 1994) et les sondes utilisées ont été marquées au radio-isotope ³²P. Les oligonucléotides correspondant à la séquence *oriC* : *gidA1* 5' CATTGGCGGGGGTCATGC 3' et *gidA2* 5'CTTGCTCTCCAGCGTCGG 3'. Les oligonucléotides correspondants à la région *Ter* : *cedA1* 5' GTTACGCGTATCAGGGGC 3' et *cedA2* 5' GAGCGACGCCACAGGATG 3'. La densité des bandes respectives a été quantifiée à partir du Phosphoimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

3. Résultats

3.1 Analyse des topoisomères des plasmides pBR322 et pPH1243 extraits des souches à l'étude – Impact de l'absence de la RNase HI au niveau du surenroulement de l'ADN.

Il a été précédemment démontré que la formation du surenroulement hyper-négatif est initiée par l'accumulation de super-tours négatifs en arrière de la polymérase ARN lorsque la topoisomérase I (*topA*) est absente (Massé & Drolet, 1999c). En effet, ces super-tours négatifs vont promouvoir la formation de R-loops qui seront pris en charge par la RNase HI (*rnhA*). De ce fait, lors de la re-hybridation du nouveau transcrit avec le brin d'ADN matrice, l'autre brin d'ADN demeure « solitaire » ce qui relaxe l'ADN. Cet ADN relaxé est un substrat pour la gyrase qui introduira davantage de surenroulement, donc augmentation de R-loops, plus d'ADN relaxé et plus d'activité de la gyrase (Drolet, 2006; Phoenix et al., 1997). De cette façon, on s'attendrait à observer chez des mutants *rnhA* une stimulation du surenroulement de l'ADN par rapport à une souche sauvage et d'autres mutants et bien évidemment une stimulation plus importante chez des doubles mutants *rnhA topA*. C'est dans cette optique que l'on a voulu déterminer l'impact de la suppression de la RNase HI dans les souches à l'étude (figure 14 et 15), en déterminant le niveau de surenroulement de l'ADN par analyse des topoisomères sur gel de chloroquine de nos d'extraits plasmidiques. Toutes les souches à l'étude ont été traitées avec de la spectinomycine, antibiotique qui stimule l'activité de surenroulement de la gyrase. En effet, en inhibant la réaction de traduction aboutissant à la synthèse protéique, cela permet l'accumulation d'ATP nécessaire pour l'activité de surenroulement. Les températures expérimentales lors de la croissance sont de 37°C, température qui rend la gyrase plus ou moins active dû à la mutation thermosensible (Ts) au niveau de la sous-unité *gyrB* tandis que 28°C, correspond à une réactivation totale de son activité. La concentration de chloroquine utilisée (7,5 µg.ml⁻¹) pour les 2 gels présentés (figure 14 et 15) nous permet avec les plasmides à l'étude

(pBR322 et pPH1243) d'obtenir une meilleure résolution des topoisomères lors de leur migration sur gel. Ainsi, si on utilise une concentration plus élevée (plus de pouvoir intercalateur) l'ADN surenroulé va migrer plus bas et à la même position que l'ADN relaxé tandis que pour une concentration plus basse, l'ADN relaxé va migrer plus haut.

La migration différentielle se fait en fonction du nombre de super-tours présent dans les topoisomères, puis on recherche la bande la plus intense qui reflète la densité de surenroulement moyenne (encadrée par des rectangles de différentes couleurs, figures 14 et 15). Plus l'ADN plasmidique extrait est surenroulé négativement, plus les topoisomères vont migrer vers le haut (bande moyenne située plus haut dans le gel), à l'inverse d'une migration vers un niveau inférieur du gel lorsque l'ADN est relaxé (bande moyenne située plus bas dans le gel).

Dans un premier temps, l'étude a consisté à faire croître la souche sauvage (VU92), les mutants *rnhA* (VU90), *gyrB*(Ts) (VU97) et *rnhA gyrB*(Ts) (VU93) selon les conditions expérimentales décrites dans la première section de la partie Matériel et méthodes. Les plasmides d'ADN extraits vont migrer sur un gel d'agarose 0,8% avec chloroquine à 7,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. L'hybridation se fait avec une sonde marquée au radio-isotope ^{32}P pour détecter le gène *bla* (gène de résistance à l'ampicilline portée par le plasmide pBR322).

La souche sauvage représente notre contrôle, ainsi lorsqu'on procède à l'analyse les topoisomères encadrés (120 mins +/- spectinomycine), on confirme qu'il y'a bel et bien une stimulation du surenroulement en présence de la spectinomycine. En effet, la bande moyenne suite à la migration de l'extrait plasmidique de cellules non-traitées après 120 min à 28°C (carré rouge, ligne 1, figure 14) est située à un niveau plus bas que celui correspondant à l'échantillon de cellules traitées avec antibiotique après 120 min à 28°C (carré rouge, ligne 2, figure 14). Notons à cet effet que le changement de température à 28°C n'a aucune influence sur le niveau de surenroulement, la gyrase étant sauvage. Chez le mutant *gyrB*(Ts), une stimulation du surenroulement est également observée après traitement à l'antibiotique à 28°C (carré jaune de ligne 6 situé à un niveau plus élevé que le

carré jaune ligne 5, figure 14). Cependant, chez les mutants *rnhA* et *rnhA gyrB(Ts)*, on observe plutôt dans les deux cas une relaxation de l'ADN après traitement à la spectinomycine et changement de température à 28°C (carré bleu de ligne 4 situé à un niveau plus bas que le carré bleu ligne 3, figure 14), (idem pour les lignes 7 et 8, figure 14). De ce fait, la suppression de la RNase HI dans nos échantillons est à l'origine d'une relaxation de l'ADN malgré que ceux-ci soient exposés à des conditions expérimentales qui devraient stimuler le surenroulement.

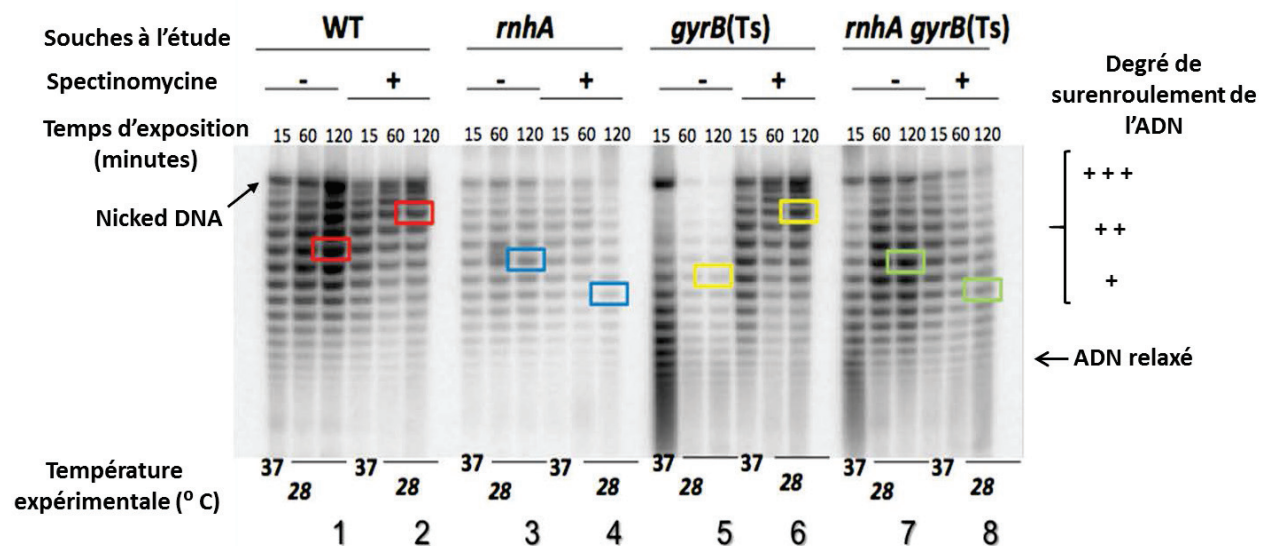


Figure 14: Effet de l'absence de la RNase HI sur le niveau de surenroulement de l'ADN.

Analyse du surenroulement de l'ADN chez la souche sauvage VU90, mutants *rnhA* VU92, *gyrB(Ts)* VU97 et *rnhA gyrB(Ts)* VU93. Pour les conditions expérimentales voir section 2.1, Matériels et méthodes. Les extractions plasmidiques ont lieu 15 mins avant le changement de température à 28°C puis 60 et 120 mins après; traitement +/- spectinomycine (400 µg.ml⁻¹). L'hybridation se fait avec une sonde marquée au radio-isotope ³²P pour détecter le gène *bla* présent sur le plasmide pBR322. Les topoisomères qui sont encadrés représentent la bande de densité moyenne de chaque migration, estimée après analyse au Phosphoimager Typhoon 9400.

Dans un second temps, l'étude a consisté à faire croître les doubles mutants *rnhA gyrB*(Ts) (VU31) et triples mutants *topA rnhA gyrB*(Ts) (VU22) dans les mêmes conditions que l'expérience précédente (figure 14), à la seule différence que l'hybridation se fait avec une sonde marquée au radio-isotope ^{32}P pour détecter le gène *bla* portée par le plasmide pPH1243 et non pBR322. En effet, les deux souches à l'étude VU22 et VU31, sont issues du background RFM475, différent de celui des souches utilisées dans l'expérience précédente (RFM430).

Tout d'abord, on observe pour les échantillons non-traités avec spectinomycine, qu'il n'y a aucune stimulation significative du surenroulement de l'ADN après changement de la température à 28°C (topoisomères lignes 1 et 2 sont plus concentrés vers le haut du gel figure 15). Entre 60 et 120 mins, on n'observe pas vraiment de différence au niveau de la stimulation du surenroulement. Les échantillons traités avec spectinomycine présentent une relaxation de leur ADN (lignes 4 et 6, figure 15). En effet, si on compare le niveau des bandes moyennes pour le double mutant *rnhA gyrB*(Ts), on remarque qu'il est plus bas pour l'échantillon traité avec l'antibiotique surtout après le changement de température à 28°C (lignes 6, figure 15); ceci se vérifie également pour le triple mutant *topA rnhA gyrB*(Ts) (lignes 3 et 4, figure 15). Par conséquent, malgré l'effet stimulateur de la spectinomycine, la réactivation de la gyrase à 28°C les échantillons à l'étude qui sont dépourvus de la RNase HI et exposés à l'antibiotique, présentent une relaxation de l'ADN. De plus, on observe que le phénotype *rnhA* est dominant sur le phénotype *topA* quand on sait qu'en absence de la topoisomerase I, il y'a plutôt une stimulation de l'hypernégatif dans les extraits (Massé & Drolet, 1999c).

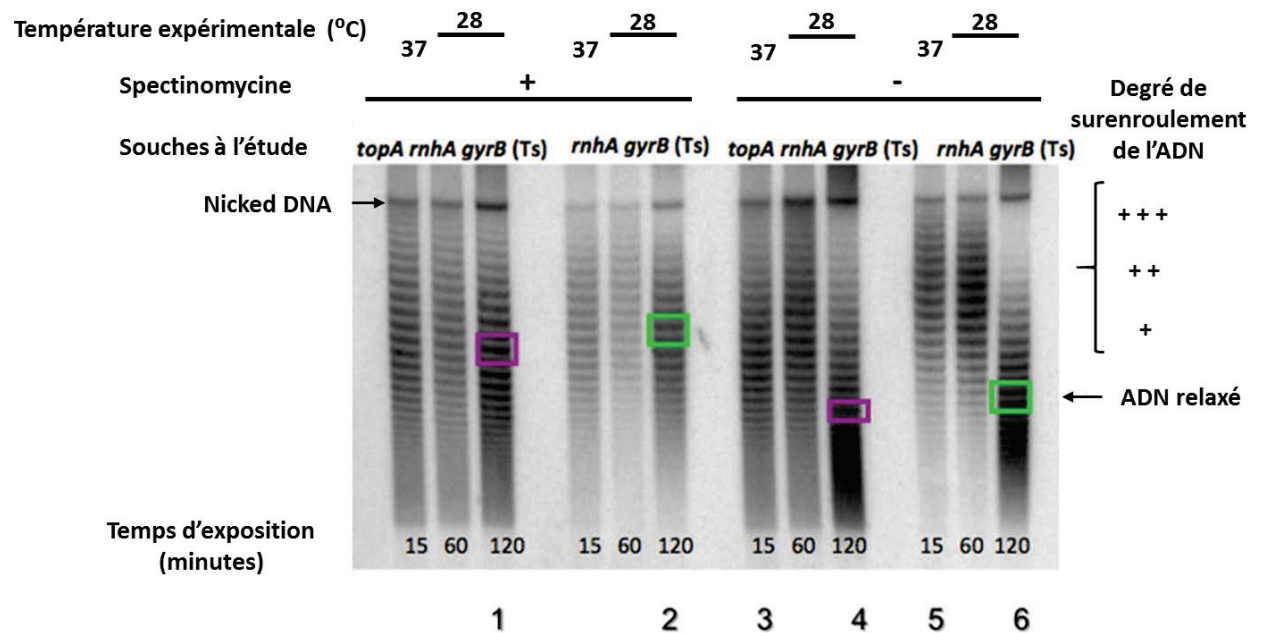


Figure 15: Effet de l'absence de la RNase HI sur le niveau de surenroulement de l'ADN.

Analyse du surenroulement de l'ADN chez le double mutant *rnhA gyrB*(Ts) (VU31) et triple mutant *topA rnhA gyrB*(Ts) (VU22). Pour les conditions expérimentales voir section 2.1, Matériel et méthode. Les extractions plasmidiques ont lieu 15 mins avant le changement de température à 28°C puis 60 et 120 mins après; traitement +/- spectinomycine (400 µg.ml⁻¹). L'hybridation se fait avec une sonde marquée au radio-isotope ³²P pour détecter le gène *bla* présent sur le plasmide pPH1243. Les topoisomères qui sont encadrés représentent la bande de densité moyenne de chaque migration, estimée après analyse au Phosphoimager Typhoon 9400.

3.2 Caractérisation des supresseurs extragéniques localisés dans le gène *rne* et corrigeant le défaut de croissance du triple mutant *topA rnhA gyrB*(Ts) – Mesure de l'activité de la RNase E de ces mutants en dosant la β -galactosidase d'une fusion T7-*lacZ*.

Dans une autre optique, il a été question de mieux caractériser l'interaction entre la RNase HI et la RNase E dans le métabolisme des R-loops et la dégradation des ARNms. Il a été question ci-dessus de l'effet de la RNase HI sur la régulation du surenroulement de l'ADN. On s'est donc interrogé sur l'origine de l'incompatibilité des deux mutations *topA* et *rnhA* (Drolet et al., 1995; Massé & Drolet, 1999b). L'utilisation de la méthode de mutagenèse au transposon Tn5 a été cruciale en vue d'isoler les supresseurs extragéniques qui corrigent le défaut de croissance de la souche *topA rnhA gyrB*(Ts) (VU22). Le défaut de croissance associé à la souche provient d'un problème de sur-réplication dû à une dérégulation du cycle cellulaire. En effet, en raison de la persistance des R-loops, plusieurs origines de réplication amorcent de nouvelles rondes de réplication ce qui est à l'origine de collision de fourches (mécanisme de cSDR). D'autre part, cette sur-réplication est également à l'origine du problème de ségrégation des chromosomes qui affecte la souche donnant lieu à des cellules anucléées ou filamenteuses. On s'intéressera aux supresseurs qui font partie de la catégorie des ribonucléases. Ceux-ci constituent une grande proportion des supresseurs isolés et ont été majoritairement obtenus suite à l'insertion du transposon Tn5 dans le gène *rne*, à des endroits correspondants à différents domaines de la RNase E (figure 16).

Parmi ces supresseurs, nous en avons sélectionné quatre pour réaliser notre étude. Parmi ces derniers, un seul (*rne*::Tn5 (aa500), figure 16) correspond à une insertion au niveau de la portion amino-terminale de la RNase E, soit à l'extrémité de la région catalytique (résidus 1 à 529, figure 16); les trois autres (*rne*::Tn5 (aa 867), *rne*::Tn5 (aa 883), *rne*::Tn5 (aa 997), figure 16) sont plutôt issus d'une insertion du Tn5 au niveau de la région correspondant à la

portion carboxy-terminale (résidus 530 à 1061, figure 16), région servant de plate-forme pour les interactions avec d'autres constituants majeurs du dégradosome tels que l'hélicase (RhlB ou Rh), l'énolase (En) et la polynucléotide phosphorylase (PNPase) (figure 16).

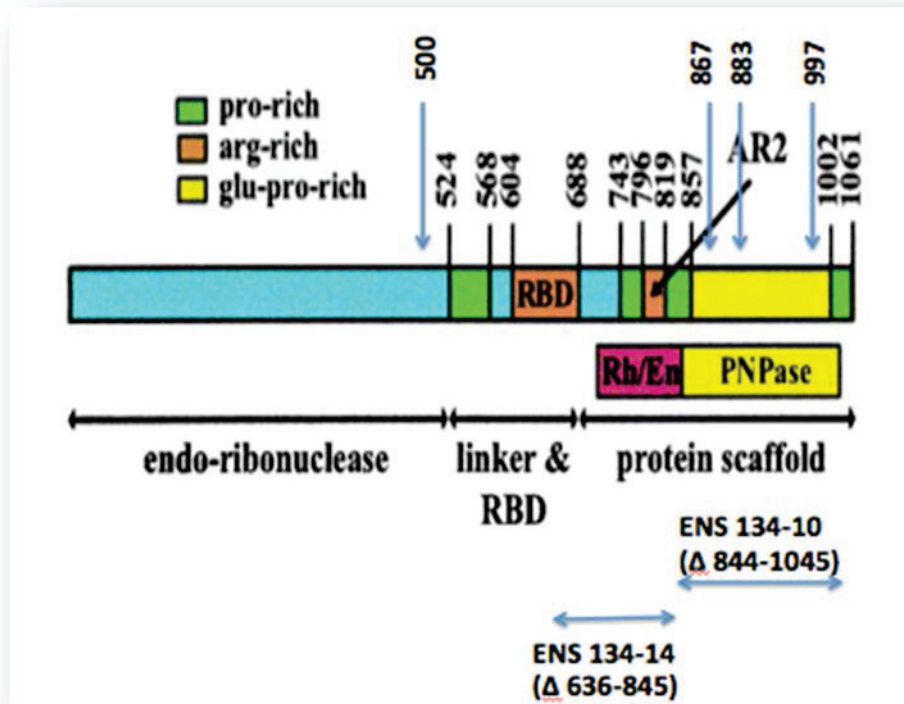


Figure 16 : Structure primaire de la Rnase E et supresseurs extragéniques (Leroy et al., 2002)

Code de couleurs selon les régions : riche en proline (Vert), riche en arginine (Orange), riche en proline et acide glutamique (Jaune). Les nombres aux extrémités des flèches bleues illustrent les acides aminés correspondants au site de l'insertion du transposon dans le gène *rne*. Figure adaptée avec la permission de *John Wiley and Sons*.

Nous avons donc entrepris de caractériser les quatre supprimeurs isolés. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'activité RNase E associée à chacun de ceux-ci. Pour

ce faire, nous avons utilisé un système qui nous permettait de remplacer le gène endogène *rne* par différentes allèles codant pour les différents suppresseurs extra-géniques à l'étude. Ensuite, l'activité de la RNase E a été estimée en utilisant un gène rapporteur P_{T7} -*lacZ* dont l'ARN messager T7-*lacZ* est très sensible à la dégradation puisque dans ce cas la transcription et la traduction sont découplées. En effet, dans le système utilisé (figure 17), l'ARN polymérase du bactériophage T7 a une capacité d'élongation plus significative que celle de la bactérie *E. coli* (Leroy et al., 2002). De ce fait, lorsque le gène *lacZ* est transcrit, il n'est pas pris en charge simultanément par les ribosomes. Il est donc possible de mesurer l'activité de la β -galactosidase pour étudier l'effet de chaque mutation sur la dégradation des ARNms *in vivo*. Le niveau d'activité β -galactosidase mesuré sera donc inversement proportionnel au niveau d'activité de la RNase E.

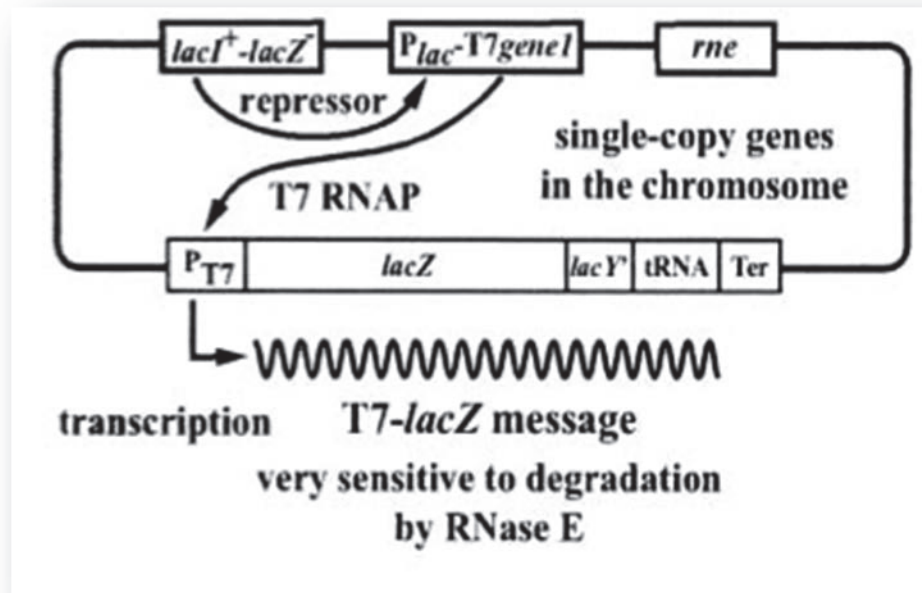


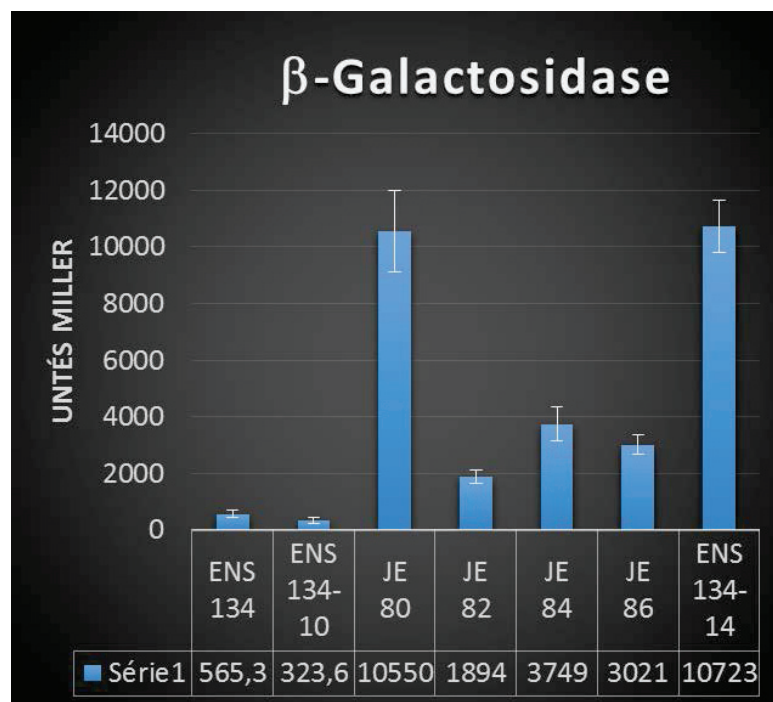
Figure 17: Schéma détaillé de la souche ENS134 (Lopez et al., 1994).

Le gène endogène *lacZ* est éliminé mais la souche code toujours pour le répresseur LacI. Plusieurs éléments ont été insérés dans le chromosome : le *gene I* codant pour l'ARN

polymérase du bactériophage T7, sous le contrôle du promoteur *lac* (P_{lac}) et un gène hybride *lacZ* sous le contrôle du promoteur T7 (P_{T7}). Le gène *lacZ* est suivi d'une petite région de l'extrémité 5' du gène rapporteur ARNt *lacY* et d'un terminateur de transcription (Ter). L'ARN T7-*lacZ* est très sensible à la dégradation par la RNase E, codée par le gène *rne*. Figure adaptée avec permission de *John Wiley and Sons* (Leroy et al., 2002).

Quatre souches ont été construites à partir de la souche sauvage ENS134, il s'agit des souches JE80 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 500)), JE82 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 997)), JE84 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 867)) et JE86 (ENS134, *rne*::Tn5 (aa 883)). Les souches ENS134-10 et ENS134-14 vont servir de contrôles, celles-ci ont déjà été caractérisées précédemment (Leroy et al., 2002). La croissance de ces souches se fait dans un milieu M9 contenant du glycérol et du casamino acides à une température de 30°C et avec IPTG jusqu'à l'obtention de la densité optique désirée ($D.O_{600nm} \cong 0.3$). Ainsi, la souche contrôle ENS134-10 (Rne Δ 10) qui se distingue par une délétion significative de la portion carboxy-terminale présente le niveau le plus faible d'activité de la β -galactosidase (figure 18). Il a été démontré que cette mutation qui empêcherait de façon spécifique l'interaction entre la RNase E et la PNPase, cause en fait une augmentation de l'activité RNase E (Vanzo et al., 1998). Ainsi, nos résultats (figure 18) montrent que la protéine Rne Δ 10 est plus active dans la dégradation de l'ARNm T7-*lacZ* que la protéine sauvage RNase E. A l'inverse, le contrôle négatif ENS134-14 (Rne Δ 14) qui est plutôt marqué par une délétion des régions RBD (figure 16, domaine de liaison à l'ARN) et Rh/En (figure 16, région où l'hélicase RhlB et l'enolase interagissent avec la RNase E), présente le niveau le plus élevé d'activité de la β -galactosidase, ce qui signifie que ces régions respectives seraient nécessaires pour une dégradation efficace de l'ARNm T7-*lacZ*. Ainsi, lorsqu'on observe l'activité de la β -galactosidase de nos quatre mutants, seule celle de la souche JE80 se distingue de façon significative par rapport aux trois autres. En effet, elle possède une activité approximativement 3 fois plus élevée que JE84 et JE86, et 6 fois plus élevée que JE82 (figure 18). De ce fait, la protéine Rne500, seule à afficher une délétion partielle de la portion amino-terminale possède une activité presque similaire à celle exprimée par le

contrôle négatif ENS134-14. D'autre part, les souches JE84 et JE86 présentent sensiblement la même activité β -galactosidase, ceci pourrait s'expliquer par des insertions du Tn5 assez rapprochées (figure 16). Toutefois, leur activité respective demeure plus élevée que celle de la souche sauvage (environ 6 fois) et notre contrôle positif ENS134-10 (environ 10 fois). Finalement, la souche JE82 présente l'activité la plus basse parmi nos quatre mutants mais elle est toujours plus élevée que celle de la souche sauvage (environ 3 fois) ou notre contrôle positif ENS134-10 (environ 6 fois). En conclusion, les supresseurs *rne* de la souche *topA rnhA gyrB(Ts)* ont une activité RNase E plus faible (surtout *rne::Tn5* (aa 500)) que celle d'une souche sauvage.



Série 1 : les valeurs de dosage pour chaque souche.

Figure 18 : Graphique illustrant le niveau de dégradation de l'ARN messager T7-lacZ lors du dosage d'activité de la β -galactosidase.

Les niveaux de β -galactosidase ont été mesurés chez la souche sauvage ENS134 et les différents mutants dérivés exprimant ainsi la protéine sauvage RNase E et les diverses

protéines mutantes. Les conditions expérimentales sont décrites dans la section 2.6, Matériels et méthodes. Les résultats représentés sont la moyenne de deux expériences (elles mêmes étant effectuées en duplicata) et les barres d'erreurs associées illustrent l'écart-type.

3.3 Effet des mutations *rne* sur la capacité d'une souche *rnhA* à survivre sans le système DnaA/*oriC*.

Suite à l'analyse de l'activité de la RNase E exprimée par nos supresseurs extragéniques, il a été question de déterminer la capacité de ceux-ci à diminuer la sur-réplication dans la souche VU22 (*topA rnhA gyrB*(Ts)) donc, soit leur capacité à diminuer le cSDR. En effet, l'isolement de nombreux supresseurs dans un gène codant pour une ribonucléase (*rne* ici), nous a rapidement fait penser que ces mutations pouvaient faire en sorte de fournir un mécanisme alternatif pour éliminer les R-loops, normalement pris en charge par la RNase HI et ainsi diminuer la sur-réplication.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons tout d'abord procédé à la construction d'un double mutant *rnhA dnaA*(Ts) (JE1) puis de triples mutants *rnhA dnaA*(Ts) + [*rne*::Tn5 (aa 500), *rne*::Tn5 (aa 867), *rne*::Tn5 (aa 883) et *rne*::Tn5 (aa 997)] à partir de la souche de départ, qui nous servira de contrôle MD48 (MC4100, *dnaA46* (Ts) *tna*::Tn10). Cette souche est thermosensible puisque sa protéine DnaA responsable de l'initiation de la réplication du chromosome est inactivée à 42°C. Cependant, si le gène *rnhA* est inactivé, la souche pourra survivre grâce à la réplication à partir de R-loops (cSDR). Ainsi, dans un premier temps, nous avons mesuré l'habileté de nos différents mutants JE1 (MD48, *rnhA*::*cam*), JE6 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 867)), JE16 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 997)), JE36 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 883)), JE63 (MD48, *rnhA*::*cam*, *rne*::Tn5 (aa 500)) et MD48 à former des colonies sur milieu solide LB à 30°C (température permissive) et à 42°C (température non-permissive) (*Efficiency of plating* : EOP). Le rapport du nombre de colonies à 30°C sur celui à 42°C représente la capacité de la souche à former des colonies à la température non-permissive ("*Efficiency of Plating*" ou EOP). La croissance des souches se fait dans un milieu LB à une température de 30°C

jusqu'à l'obtention de la densité optique désirée ($D.O_{600nm} \cong 0.7$). Les colonies sont dénombrées après 36 hrs d'incubation. On remarque que notre contrôle MD48 présente une EOP équivalente à $2,4 \times 10^{-6}$. Autrement dit, environ 2 cellules sur 10^6 sont capables de survivre à la température restrictive, ce qui est en accord avec le fait que le système de réplication *DnaA/oriC* est bel et bien inactif à cette température. En ce qui concerne la souche JE1 une EOP équivalente dans ce cas-ci à $2,9 \times 10^{-1}$ a été obtenue. Cette valeur est de façon très significative supérieure à celle de MD48 et s'explique par le fait que dans cette souche la réplication du chromosome peut se faire à partir de R-loops via le cSDR dû à l'absence de la RNase HI. Pour ce qui est de nos souches JE6, JE16 et JE36, on obtient des valeurs d'EOP correspondant respectivement à $2,5 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$ et $3,8 \times 10^{-3}$ (Tableau 3). Il est donc évident que les mutations dans la RNase E portées par ces souches ont un effet dramatique sur le cSDR (comparé avec JE1, EOP de $2,9 \times 10^{-1}$).

En revanche, la souche JE63 se comporte d'une autre manière dans la mesure où elle ne présente aucune habileté à former des colonies à la température restrictive de 42°C. En effet, elle est pire que notre contrôle MD48 qui affiche tout de même une croissance à la dilution 10^0 . Ceci suggère que la protéine DnaA(Ts) à la température restrictive serait incompatible avec la protéine exprimée par notre mutant *rne::Tn5* (aa 500). Cette dernière a la particularité d'être la seule issue d'une insertion du Tn5 au niveau de la région amino-terminale. Dans l'optique de confirmer cette hypothèse, on a évalué l'habileté des mutants *rne* à affecter la mutation *dnaA*(Ts). Il a ainsi été question de construire des doubles mutants *dnaA*(Ts) + [*rne::Tn5* (aa 500), *rne::Tn5* (aa 867), *rne::Tn5* (aa 883) et *rne::Tn5* (aa 997)] , il s'agit donc des souches JE101(MD48, *rne::Tn5* (aa 997)), JE103 (MD48, *rne::Tn5* (aa 500)), JE107 (MD48, *rne::Tn5* (aa 867)) et JE119 (MD48, *rne::Tn5* (aa 883)).

Tableau 3 : Valeurs d'*Efficiency of plating* après 36 heures d'incubation sur un milieu riche LB

Souches à l'étude	Valeurs d'E.O.P	Nombre de cellules capables de survivre à température restrictive de 42°C
MD48 (MC4100, <i>dnaA46</i> (Ts) <i>tna::TnI0</i>)	$2,4 * 10^{-6}$	$2 / 10^6$
JE1 (MD48, <i>rnhA::cam</i>)	$2,9 * 10^{-1}$	$3 / 10$
JE6 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 867))	$2,5 * 10^{-3}$	$3 / 10^3$
JE16 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 997))	$2,5 * 10^{-3}$	$3 / 10^3$
JE36 (MD48, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 883))	$3,8 * 10^{-3}$	$4 / 10^3$
JE101 (MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 997))	$1,6 * 10^{-5}$	$2 / 10^5$
JE103 (MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 500))	0	N.A
JE107 (MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 867))	$1,6 * 10^{-7}$	$2 / 10^7$
JE119 (MD48, <i>rne::Tn5</i> (aa 883))	$4,1 * 10^{-6}$	$4 / 10^6$

N.A : Donnée non-applicable.

On constate donc que chez nos doubles mutants, seule la souche JE103 qui exprime la protéine issue de l'insertion *rne::Tn5* (aa 500) ne présente aucune croissance à une température non-permissive de 42°C. On confirme donc par le fait même qu'il y'aurait une incompatibilité entre cette mutation dans la région amino-terminale et la mutation thermosensible de la protéine DnaA.

Il a été démontré que le milieu de culture jouait un rôle crucial dans la cinétique des réactions se déroulant au sein des cellules bactériennes. Ainsi, plus le milieu est riche, plus

la croissance sera rapide ce qui implique une vitesse de réplication optimale (Fossum et al., 2007). La protéine DnaA sera synthétisée en quantité suffisante pour initier de nouvelles rondes de réplication avant que les précédentes ne soient complétées. Ceci explique la sensibilité des mutants *rnhA* lors de leur croissance sur milieu riche, puisque ceux-ci en plus du système de réplication DnaA-dépendant, expriment le cSDR aboutissant à une sur-réplication et une collision de fourches (Kogoma et al., 1993).

C'est dans cette optique que la prochaine expérience a été réalisée sur milieu pauvre M9; le taux d'initiation à *oriC* étant significativement plus bas. On pourra dans ces conditions observer les différents phénotypes associés à chaque supresseur par rapport à la persistance des R-loops et donc le cSDR. Les souches utilisées sont les mêmes qui ont permis de réaliser l'expérience d'EOP. La croissance de ces souches se fait dans un milieu M9 supplémenté de glucose, tryptophane et de casamino acides, à une température de 30°C jusqu'à l'obtention de la densité optique désirée ($D.O_{600nm} \cong 0.7$). Les stries quantitatives seront obtenues après inoculation de 20 µl des différentes cultures sur gélose M9 (glucose, tryptophane et casamino acides) pour une incubation à 42°C (température restrictive) pendant 48 h et 72 h.

Il sera question de comparer le degré de croissance en se basant sur l'étendue des stries entre la souche JE1 qui présente comme on l'a vu dans l'expérience précédente le niveau de cSDR le plus élevé, avec les souches MD48, JE6, JE16, JE36 et JE63 (figure 25 à 29). Ces souches conformément à l'expérience d'EOP devrait présenter un cSDR nul (MD48) ou intermédiaire (JE6, JE16, JE36 et JE63). On remarquera ainsi que dans tous les cas, la croissance après 72h sera plus importante que celle après 48h et que les colonies seront plus grosses, en raison du temps supplémentaire d'incubation. Les résultats attendus sont observés, dans la mesure où la souche MD48 présente une croissance seulement en début de stries et ce après 48h et 72h alors que la croissance chez la souche JE1 est étendue sur les $\frac{3}{4}$ de la gélose après 72h (figure 19). On observe que nos supresseurs affichent des phénotypes intermédiaires entre les souches MD48 et JE1 (figure 20 à 22). En effet, la

croissance chez les souches JE6 (figure 20), JE16 (figure 21) et JE36 (figure 22) s'étend à moins de la moitié de la gélose M9 après une incubation de 72h.

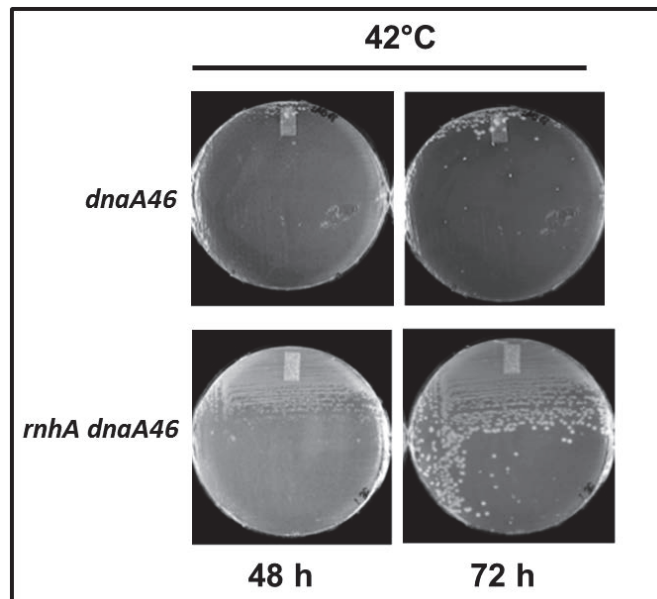


Figure 19 : Expérience de stries quantitatives pour les souches MD48 (*dnaA46*) et JE1 (*rnhA dnaA46*) sur milieu M9.

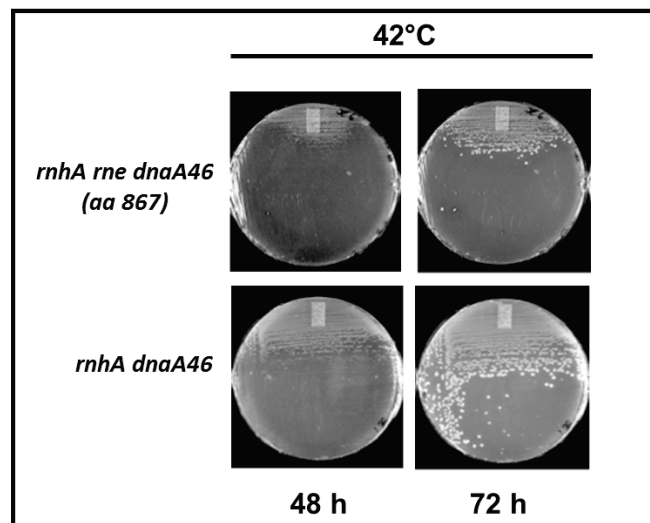


Figure 20 : Expérience de stries quantitatives pour les souches JE6 (*rnhA rne dnaA46* (aa 867)) et JE1 (*rnhA dnaA46*) sur milieu M9.

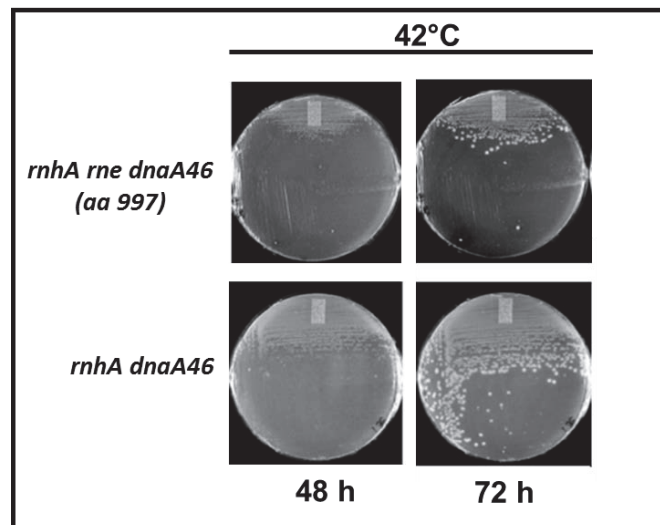


Figure 21 : Expérience de stries quantitatives pour les souches JE16 (*rnhA rne dnaA46* (aa 997)) et JE1 (*rnhA dnaA46*) sur milieu M9.

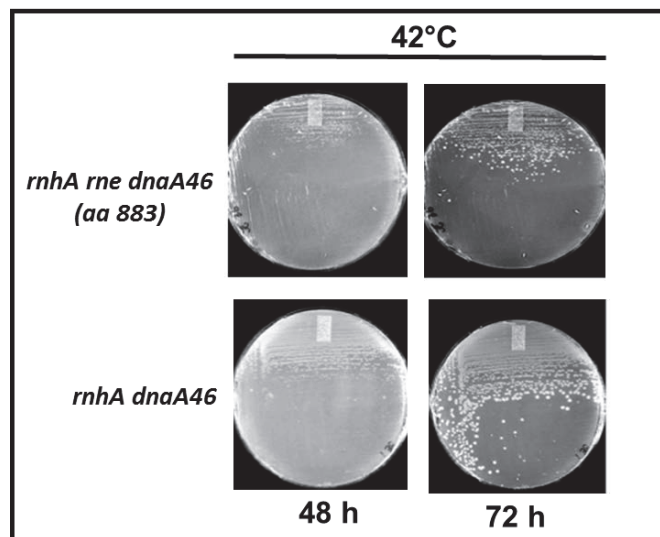


Figure 22: Expérience de stries quantitatives pour les souches JE36 (*rnhA rne dnaA46* (aa 883)) et JE1 (*rnhA dnaA46*) sur milieu M9.

L'observation faite dans l'expérience d'EOP se confirme également pour celle des stries quantitatives concernant la souche JE63 (figure 23). En effet, celle-ci affiche une croissance limitée au niveau du début de la strie tout comme la souche MD48 (figure 19). Donc, dans l'ensemble nos résultats montrent qu'une délétion dans la partie C-terminale de la RNase E peut compléter en bonne partie l'absence de la RNase HI et ainsi réduire considérablement le niveau de réplication cSDR. On ne peut cependant pas établir de relations strictes entre le niveau d'activité RNase E et la capacité à réduire le cSDR.

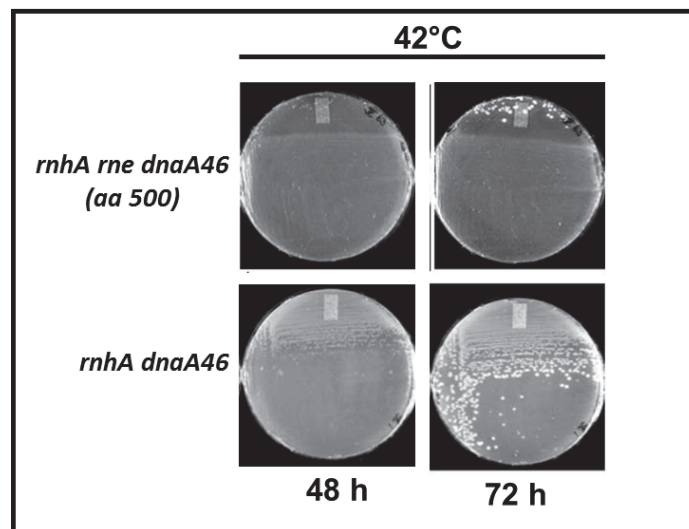


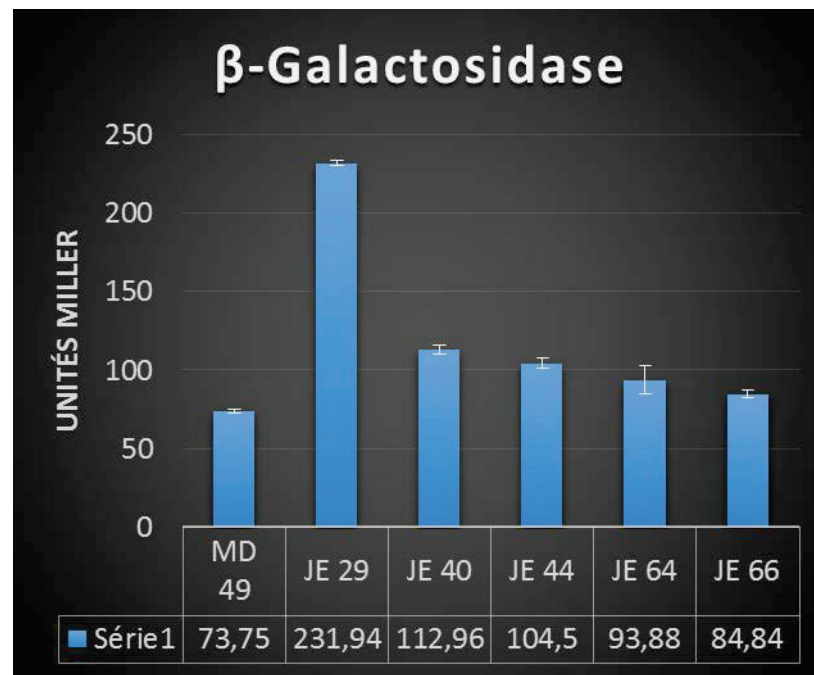
Figure 23: Expérience de stries quantitatives pour les souches JE63 (*rnhA rne dnaA46* (aa 500)) et JE1 (*rnhA dnaA46*) sur milieu M9.

3.4 Effet des mutations *rne* sur la réponse SOS dans le mutant *rnhA*.

En outre, il a déjà été démontré que les mutants *rnhA* expriment de façon constitutive la réponse SOS (Kogoma, 1994). Effectivement, des études chez les mutants *rnhA224* et *rnhA339::cat*, où l'activité de la RNase HI est absente, démontrent que ceux-ci expriment de façon chronique la fusion transcriptionnelle *sfiA::lacZ* (Kogoma et al., 1993). C'est dans cet ordre d'idées qu'on a voulu caractériser nos supprimeurs par rapport à leur capacité à compenser l'absence de la RNase HI et ce en diminuant l'induction de la réponse SOS. En effet, il est question de mesurer l'induction de la réponse SOS en déterminant le niveau d'expression du gène *sfiA* fusionné à *lacZ*.

Cette expérience est réalisée avec un milieu VB casa Kogoma (moins riche que le milieu LB) et les souches utilisées sont dérivées de la souche de départ MD49 (AQ8107: *sfiA::lacZ*). Il s'agit dans un premier temps d'insérer l'allèle *rnhA::cam* (JE29) puis d'introduire les différents allèles correspondants à nos supprimeurs JE40 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 867)), JE44 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 997)), JE64 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 500)) et JE66 (MD49, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 883)). On remarque donc à partir du graphique que la valeur la plus basse correspond à celle de la souche sauvage qui nous sert de contrôle (figure 24). En effet, celle-ci exprime l'allèle sauvage de la RNase HI et représente donc le niveau d'expression du gène *sfiA* lorsqu'il n'y a à priori aucune induction de la réponse SOS. De plus, il est normal d'observer que la souche JE29 (MD49, *rnhA::cam*) présente le niveau d'expression le plus élevé pour le gène à l'étude. Cette souche témoigne donc de l'absence de la RNase HI et par le fait même de l'induction de la réponse SOS. Son niveau d'expression est environ 3 fois supérieur à la normale tel qu'énoncé dans une expérience précédente utilisant la même souche contrôle AQ8107 (Kogoma, 1994). Concernant nos différents supprimeurs, on se rend compte par ces résultats qu'ils affichent tous un niveau d'expression du gène *sfiA* plus bas que celui de la souche JE29. Ceci suggère qu'ils sont en mesure de diminuer l'induction de la réponse

SOS, lorsqu'ils sont exprimés tout comme la RNase HI sans toutefois être aussi efficace qu'elle (figure 24).



Série 1 : les valeurs de dosage pour chaque souche.

Figure 24 : Graphique illustrant la mesure de l'induction de la réponse SOS en déterminant le niveau d'expression du gène *sfiA* fusionné à *lacZ*.

Les niveaux de β -galactosidase ont été mesurés chez la souche sauvage MD49 ainsi que chez les différentes souches dérivées JE29, JE40, JE48, JE64 et JE66. Les conditions expérimentales sont décrites dans la section 2.5, Matériels et méthodes. Les résultats représentés sont la moyenne de deux expériences et les barres d'erreurs associées illustrent l'écart-type.

3.5 Analyse par cytométrie en flux de la réplication dans nos différentes souches à l'étude.

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse couramment utilisée qui permet de caractériser individuellement de manière qualitative et quantitative chaque cellule d'une population bactérienne. En effet, elle permet entre autre d'identifier et de quantifier le contenu en ADN de cellules dans une population donnée et révèle des informations pertinentes sur le cycle cellulaire (Gasol et al., 1999). C'est ainsi qu'à l'aide de cette technique on a voulu déterminer dans un premier temps, si nos mutants, en diminuant le cSDR (responsable d'une dérégulation du cycle cellulaire), pouvaient également restaurer la synchronisation du cycle cellulaire.

Dans le cadre de cette expérience le fluorochrome utilisé est le « Sytox[®] Green nucleic acid stain », qui possède une haute affinité pour les acides nucléiques, particulièrement l'ADN. Le traitement des cellules sera réalisé par ajout de rifampicine, antibiotique qui, en inhibant la transcription, prévient toute nouvelle initiation de la réplication dans la cellule. En effet, l'initiation de la réplication à *oriC* demande une activité transcriptionnelle en *cis*, tout comme la réplication cSDR étant initiée à partir de R-loops. La croissance des souches à l'étude est réalisée à une température de 37°C dans un milieu M9 supplémenté de tryptophane, glucose et casamino acides, jusqu'à la densité optique désirée ($D.O_{600nm} \cong 0.3$), puis celles-ci sont traitées pendant deux heures avec de la rifampicine (300 µg/ml), pour permettre la complétion des cycles de réplication déjà initiés. Les souches utilisées sont VU92 (RFM430 pBR322), le type sauvage, de même que VU90 (RFM430, *rnhA::cam* pBR322) et ses dérivés, soient les souches JE130 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 867) pBR322), JE131 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 997) pBR322), JE58 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 500) pBR322) et JE54 (RFM430, *rnhA::cam*, *rne::Tn5* (aa 883) pBR322). Dans tous les graphiques (figures 25 à 27), les données en abscisses et ordonnées représentent respectivement la fluorescence ou intensité du signal (quantité d'ADN) et le nombre de cellules.

Initialement nous avons d'abord comparé le degré de synchronisation du mutant *rnhA::cam* (VU90) vis à vis de la souche sauvage (VU92). Ainsi, on remarque à partir de l'histogramme des cellules traitées à la rifampicine (figure 25-B) qu'il y'a formation de deux pics bien distincts chez VU92, représentant les cellules avec 2 chromosomes (1^{er} pic → 200) et 4 chromosomes (2^{ème} pic → 400). Autrement dit, ces cellules avaient respectivement 2 et 4 *oriC* activés avant l'ajout de rifampicine. En revanche, chez VU90, les 2 pics ne sont pas clairement dissociés et l'histogramme illustre une très large fraction de cellules avec un nombre irrégulier de chromosomes ($\neq 2n$, où $n = 1, 2, 3$) témoignant d'un réglage aléatoire de l'initiation possiblement dû au cSDR. Pour calculer la valeur moyenne pour la quantité d'ADN par cellule on divise la valeur moyenne de la fluorescence (sans traitement) par la valeur moyenne de la taille relative des cellules (sans traitement). Ceci s'appliquera pour tous les histogrammes (figures 25 à 28). Cette valeur est presque similaire ici (VU90 → 19,43; VU92 → 19,31). A travers les histogrammes suivants (figure 26), on constate que les supresseurs (JE130, JE131 et JE54) à l'étude ne régularisent pas le cycle cellulaire (figure 26-B). En effet, les quatre histogrammes ont sensiblement le même profil. Toutefois, on observe une diminution de la quantité d'ADN pour les supresseurs (JE130 → 12,76 ; JE131 → 15,87; JE54 → 12,67) par rapport à la souche VU90. Ceci s'observe bien sur les histogrammes puisque même si pour le 1^{er} pic le plus grand nombre de cellules appartiennent à la souche JE130, entre les 2 pics pour la même valeur d'intensité du signal (fluorescence $\cong 320$), le pic le plus bas appartient à l'histogramme de la souche JE130, qui se confond avec celui de la souche JE54, puis celui de la souche JE131 et enfin le pic le plus élevé appartient à celui de la souche VU90. La même observation est faite pour le 2^{ème} pic (fluorescence $\cong 400$). Ces résultats suggèrent donc que même si le « timing » de l'initiation continue d'être aléatoire, il est moins important d'où la valeur moyenne de la quantité d'ADN pour les supresseurs à l'étude. Concernant le troisième cas de figure (figure 27), on observe une fois de plus concernant la souche JE58 (exprimant la protéine issue de l'insertion *rne::Tn5* (aa 500)) un profil différent de la souche VU90 (figure 27-B) et dans le même cas différents des autres

suppresseurs à l'étude (figure 26-B). Il y'a cependant une diminution de la valeur moyenne de la quantité d'ADN par cellule (JE58 → 9,6), ceci suggère qu'il y'a bien un problème avec le système DnaA/*oriC* dans cette souche.

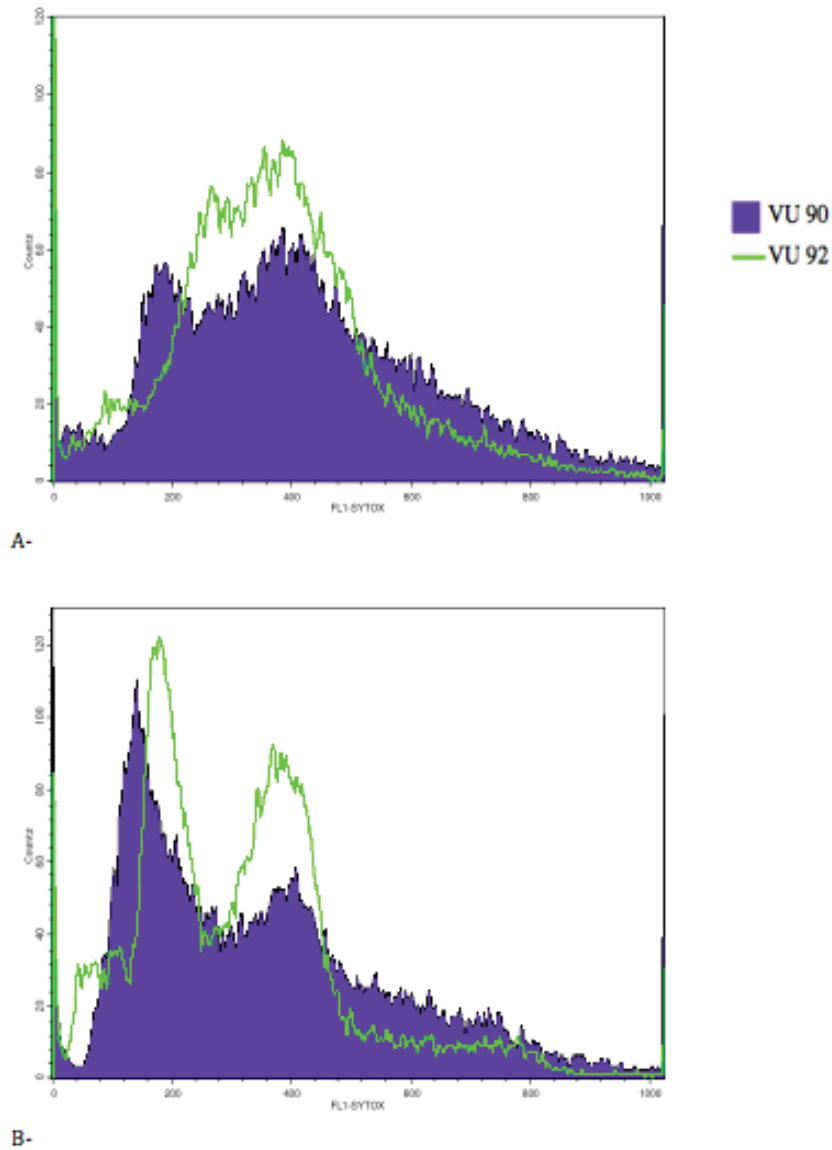
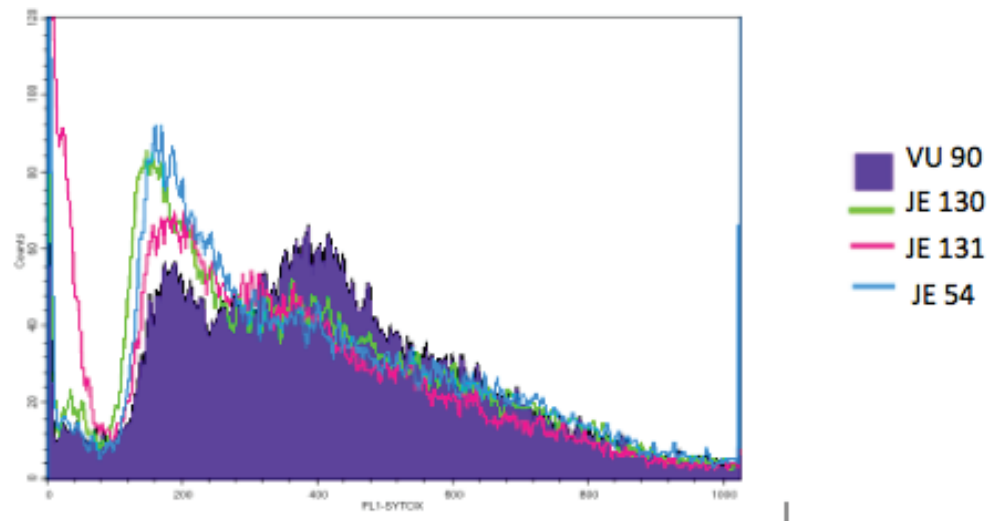


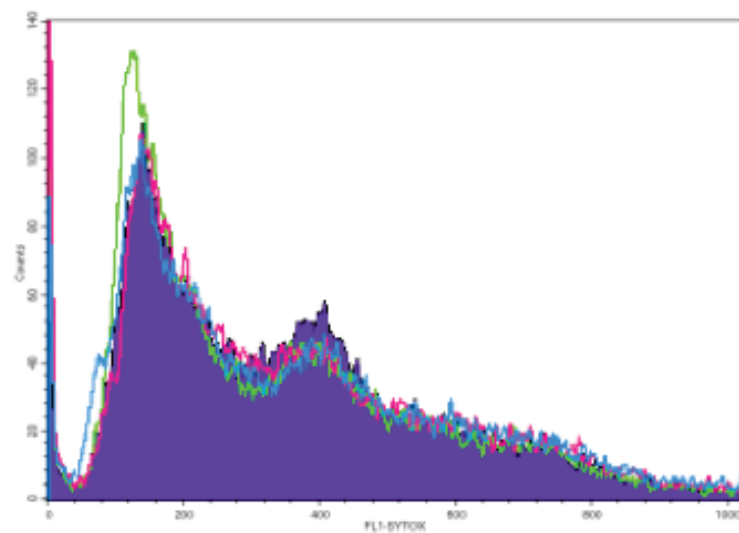
Figure 25: Distribution de la masse d'ADN et degré de synchronisation du cycle cellulaire pour les souches VU90 et VU92 par cytométrie en flux.

Les graphiques A et B (sans rifampicine et avec rifampicine respectivement)

Valeurs moyennes quantité d'ADN par cellule : **19,31** (VU92) et **19,43** (VU90)



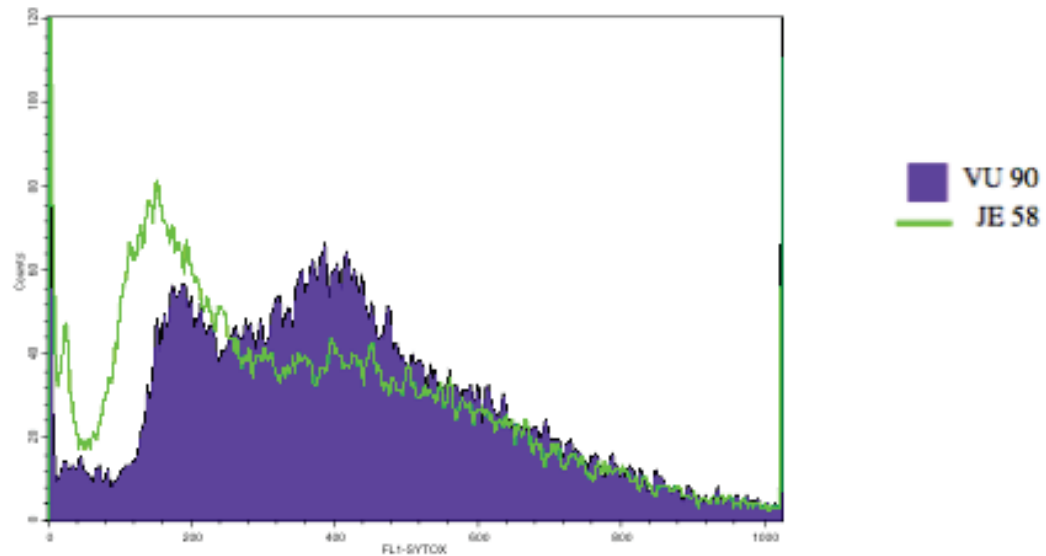
A- sans rifampicine



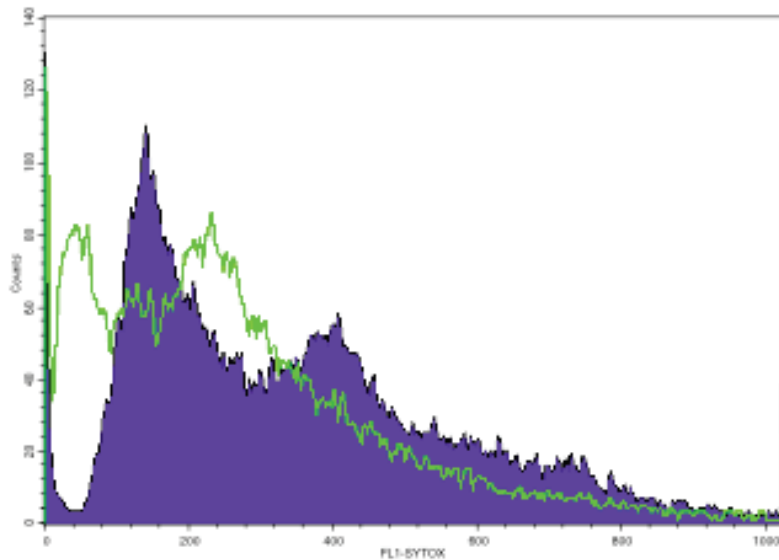
B- avec rifampicine

Figure 26 : Distribution de la masse d'ADN et degré de synchronisation du cycle cellulaire pour les souches VU90, JE130, JE131 et JE54 par cytométrie en flux.

Valeurs moyennes quantité d'ADN par cellule : 12,76 (JE130); 15,87 (JE131); 12,67 (JE54) et 19,43 (VU90)



A- sans rifampicine



B- avec rifampicine

Figure 27 : Distribution de la masse d'ADN et degré de synchronisation du cycle cellulaire pour les souches VU90 et JE58 par cytométrie en flux.

Valeurs moyennes quantité d'ADN par cellule : 9,6 (JE58) et 19,43 (VU90)

3.6 Mesure du niveau de cSDR chez nos supresseurs en analysant le ratio *oriC/Ter*

Pour conclure l'analyse de nos supresseurs exprimant les protéines issues de l'insertion *rne::Tn5* (aa 500), *rne::Tn5* (aa867), *rne::Tn5* (aa 883) et *rne::Tn5* (aa 997), nous avons voulu plus directement mesurer le niveau de cSDR dans nos souches portant les différents supresseurs. Les sites *oriKs* où l'on observe principalement l'initiation du cSDR se localisent principalement dans la région Ter du chromosome (Kogoma, 1997). De ce fait, une souche où le cSDR est réduit devrait avoir un ratio *oriC/Ter* plus élevé qu'une souche où il est présent, puisque dans celle-ci la région Ter sera plus fortement répliquée. Nous avons donc utilisé la technique de « Southern Blotting » avec des sondes spécifiques respectivement à *oriC* et *Ter*, puis en quantifiant les signaux d'hybridation nous avons pu déterminer le ratio *oriC/Ter*. Les souches à l'étude sont les mêmes que celles utilisées pour la cytométrie. L'expérience est réalisée selon les conditions expérimentales décrites dans la section 2.7, voir Matériels et méthodes.

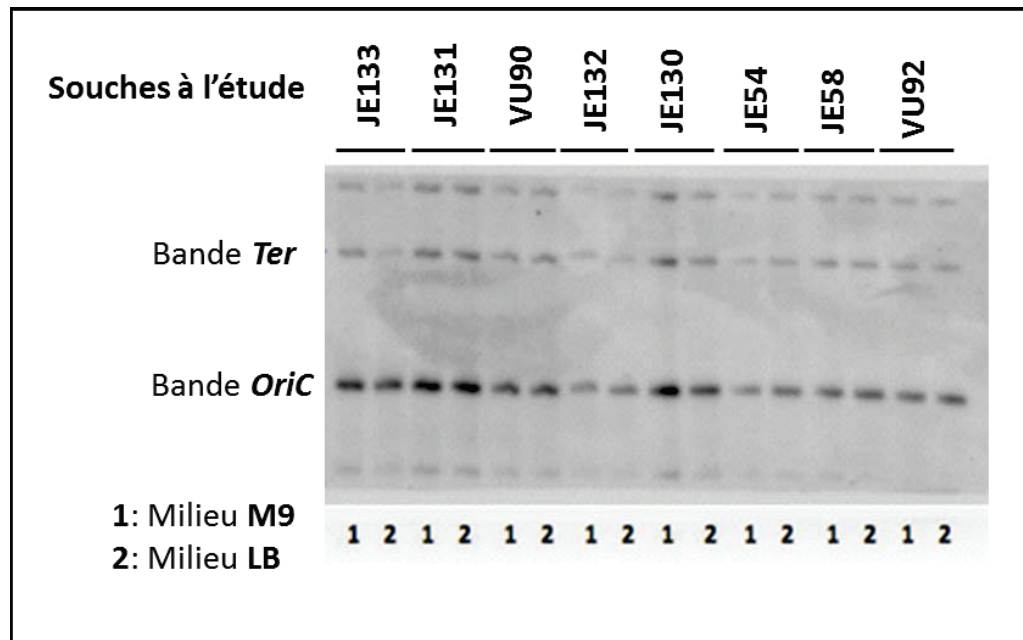


Figure 28: Expérience de « Southern Blotting » pour déterminer le ratio *OriC*/*Ter*.

Les bandes ciblées sont les bandes *oriC* (environ 7 kb) et *Ter* (environ 4 kb). Les souches à l'étude sont cultivées à une température de 37°C dans un milieu riche LB et un milieu pauvre M9 contenant du tryptophane (0,05 %).

Tableau 4: Ratios *oriC/Ter* des souches à l'étude ayant poussé dans un milieu LB et M9 (tryptophane) à une température de 37°C. Ces valeurs représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

Souches à l'étude	Ratio <i>oriC/Ter</i>	
	Milieux de croissance	
	M9	LB
VU90 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> pBR322)	3,7	3,4
VU92 (RFM430 pBR322)	3,7	6,9
JE130 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 867) pBR322)	3,3	3,8
JE131 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 997) pBR322)	3,9	4,1
JE54 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 883) pBR322)	4	4,6
JE58 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> , <i>rne::Tn5</i> (aa 500) pBR322)	3,7	4,4
JE132 (RFM430, Δ (<i>srl-recA</i>)306:: <i>TnI0</i> pBR322)	3,2	5,1
JE133 (RFM430, <i>rnhA::cam</i> , Δ (<i>srl-recA</i>)306:: <i>TnI0</i>)	4,1	11,6

Dans un premier temps, si l'on compare les ratios *oriC/Ter* des milieux M9 et LB on constate des valeurs semblables pour toutes les souches, exceptée la souche sauvage dans laquelle le ratio augmente clairement (VU92). Pour la souche sauvage, cette augmentation s'explique par une initiation plus fréquente à *oriC* en milieu riche, ce qui a pour effet d'augmenter le ratio *oriC/Ter*. Dans un mutant *rnhA::cam*, cette augmentation de l'activité à *oriC* est masquée par une augmentation de l'activité cSDR dans la région *Ter*, ce qui explique l'absence d'une augmentation du ratio *oriC/Ter*. Par ailleurs, comme le cSDR est plus ou moins diminué par la présence de supprimeurs extragéniques *rne*, le ratio *oriC/ter* est également plus ou moins élevé dans les souches *rnhA* portant ces supprimeurs.

Pour confirmer que le ratio *oriC/ter* est réellement influencé par le cSDR, nous avons effectué une expérience additionnelle basée sur l'observation que la région *ter* du chromosome est hyper-recombinogénique (RecA-dépendant). Cela est dû à la collision des fourches de réplication qui terminent la réplication bidirectionnelle du chromosome initiée à *oriC*. Ce nombre de collisions devrait augmenter substantiellement dans un mutant *rnhA::cam* à cause du cSDR dans la région *Ter*. D'autre part, ces collisions entraînent des cassures double-brins qui sont pris en charge et réparées par la protéine RecA. En l'absence de cette dernière, il y aurait dégradation (par RecBCD) de cette région et donc augmentation du ratio *oriC/ter*. Cette augmentation devrait donc être encore plus importante dans une souche *recA* à cause du cSDR. C'est exactement ce que l'on a observé. En effet, les ratios *oriC/ter* sont respectivement de 5,1 (JE132) et 11,6 (JE133) pour les souches *recA* et *recA rnhA::cam* dans le milieu LB, où il y a un niveau significatif de cSDR.

4. Discussion

4.1 La RNase HI joue un rôle majeur au niveau de la topologie de l'ADN

Chez les procaryotes, le surenroulement de l'ADN est étroitement régulé par l'activité antagoniste de deux topoisomérases. Il s'agit d'une part de la gyrase, enzyme essentielle qui représente la principale topoisomérase de type II étant donné sa capacité à introduire du surenroulement négatif (activité énergivore) et à relaxer les super-tours positifs. D'autre part, la topoisomérase de type I (*topA*) dont une des activités majeures est la relaxation du surenroulement négatif induit lors de la phase d'élongation pendant la transcription (Massé & Drolet, 1999a, 1999b). Par ailleurs, on a toujours eu tendance à attribuer à la RNase HI, endoribonucléase ubiquitaire, une fonction essentielle se résumant au métabolisme des ARNs dans la cellule. Nos résultats nous ont permis de démontrer qu'en plus de ce rôle déjà reconnu, cette enzyme a un impact majeur dans la topologie de l'ADN et par conséquent l'expression génique. En effet, dans un premier temps on constate que la suppression de la RNase HI, dépendamment des souches à l'étude, module considérablement le surenroulement de leur ADN. Ainsi, à travers l'expérience illustrée par la figure 14, on a voulu déterminer le niveau de surenroulement de quatre souches dont la souche sauvage VU92, et les mutants *rnhA* VU90, *gyrB*(Ts) VU97 et *rnhA gyrB*(Ts) VU93. Le traitement à la spectinomycine dans le cadre de cette expérience permet la stimulation de l'activité de surenroulement par la gyrase. La souche contrôle (souche sauvage) démontre sans équivoque le bon déroulement de l'expérimentation. Effectivement, on remarque qu'en présence de spectinomycine la bande de densité moyenne (120 mins, ligne 2, figure 14) est située à un niveau nettement plus élevé que celle qui est désignée pour les mêmes conditions mais sans antibiotique (120 mins, ligne 1, figure 14). Donc, lorsque la gyrase est sauvage, il y'a une stimulation de son activité de surenroulement puisque le traitement à la spectinomycine augmente le pool d'ATP

cellulaire utilisé par sa sous-unité ATP-asiue GyrB. Le même constat s'observe également pour le mutant *gyrB*(Ts), dans la mesure où il y'a toujours une stimulation du surenroulement en présence de spectinomycine. La mutation thermosensible qui affecte ainsi la gyrase ne semble pas modifier son activité. En effet, cette thermo-sensibilité la rend plus ou moins inactive à 37°C et la réactive totalement à 28°C; de cette façon, on observe sans faute une stimulation du surenroulement après le changement de température à 28°C (120 mins, ligne 6, figure 14). La bande de densité moyenne (+ spectinomycine) dans ce cas-ci, étant toujours située a un niveau supérieur du gel comparativement à celle de la densité moyenne désignant le traitement sans antibiotique (120 mins, ligne 5, figure 14). Il est important de mentionner que l'analyse est plus facile lorsque les souches sont exposées plus longtemps (120 mins) à l'antibiotique, de cette façon l'effet est plus considérable, ce qui justifie l'encadrement des bandes à ce temps précis de l'expérimentation. En ce qui concerne les mutants *rnhA* et *rnhA gyrB*(Ts) on observe l'effet contraire. Effectivement, bien loin de stimuler le surenroulement, le traitement à la spectinomycine entraine plutôt la relaxation de l'ADN. Les bandes de densité moyenne correspondants aux lignes 4 et 8 (120 mins, + spectinomycine) sont situées à un niveau inférieur sur le gel par rapport à celles désignant respectivement les mêmes conditions expérimentales sans antibiotique, les lignes 3 et 7 (120 mins, - spectinomycine). En fait, la RNase HI n'étant pas présente dans la cellule pour la digestion des transcrits d'ARNs, à l'origine de la formation d'hybride d'ARN/ADN. On va assister à la ré-hybridation de cet ARN nouvellement transcrit avec un des brins d'ADN, délaissant son complémentaire non-apparié ce qui va relaxer la double hélice d'ADN (Usongo et al., 2008). Or, l'ADN relaxé est un substrat pour la gyrase, qui devrait y introduire des super-tours négatifs en présence d'ATP. On devrait ainsi, en présence de spectinomycine qui octroie davantage d'ATP à la gyrase observer une stimulation du surenroulement telle qu'observé chez notre souche contrôle et le mutant *gyrB*(Ts). De plus, l'on sait que le mutant *gyrB*(Ts) se comporte comme une souche sauvage, de cette façon le double mutant *rnhA gyrB*(Ts) devrait se comporter comme le mutant *rnhA*. Autrement dit, toutes les conditions seraient présentes pour que l'on observe

une stimulation du surenroulement chez les quatre souches à l'étude après exposition à l'antibiotique. De ce fait, la relaxation observée chez les souches VU90 (ligne 4, figure 14) et VU93 (ligne 8, figure 14) ne se justifie que par une inhibition de l'activité de surenroulement de l'ADN par la gyrase. L'absence de la RNase HI déclencherait donc une réponse cellulaire inhibant l'activité de surenroulement de la gyrase.

4.2 L'analyse du surenroulement de l'ADN révèle que le phénotype *rnhA* est dominant sur le phénotype *topA*

Dans le même ordre d'idées, on a voulu déterminer le niveau de surenroulement de l'ADN en analysant la migration différentielle des topoisomères du double mutant *rnhA gyrB*(Ts) et du triple mutant *topA rnha gyrB*(Ts). On sait que chez le mutant *topA*, le défaut de croissance est étroitement lié à l'accumulation d'un excès de surenroulement négatif généré en amont de la polymérase par la gyrase (Massé & Drolet, 1999a). Sachant que la spectinomycine stimule le surenroulement et de plus qu'il y'a réactivation de la gyrase à 28°C, on devrait plutôt observer des topoisomères révélant de l'hyper-négatif; autrement dit, la bande de densité moyenne devrait être situé a un niveau nettement supérieur qu'à celui observé (120 mins, ligne 4, figure 15). La relaxation de l'ADN dans ce cas-ci est également attribuée à la synthèse d'un inhibiteur de l'activité de surenroulement de la gyrase. L'absence de la RNase HI dans la cellule pourrait être considérée comme un stress ou signal qui déclencherait la synthèse de cet inhibiteur. En effet, en dépit du fait que la fonction de la topoisomérase de type I soit cruciale dans la régulation rigoureuse de la dynamique qui se crée lors des réactions telles la réplication et la transcription (modification transitoire du surenroulement lors du déplacement des polymérase), le phénotype *rnhA* est dominant sur le phénotype *topA*. Il est également important de mentionner que cet effet de la RNase HI est réversible dans la mesure où lorsqu'elle est surproduite dans la cellule, le niveau de surenroulement de l'ADN est rétablit; cette

relaxation de l'ADN ne serait donc pas due à une mutation. La RNase HI en plus d'être une enzyme importante dans le métabolisme des R-loops, joue donc un rôle déterminant dans la topologie de l'ADN.

En vue de mieux élucider l'impact de la RNase HI, il a été question d'isoler par la méthode de mutagenèse au transposon Tn5, les supresseurs extragéniques corrigeant le défaut de croissance chez le triple mutant *topA rnhA gyrB*(Ts). Ce défaut de croissance est associé à un problème de sur-réplication lié d'une part à la persistance des R-loops au sein de la cellule, devenant de potentielles origines de réplication. Des supresseurs ont été obtenus suite à l'insertion du transposon Tn5 dans le gène *rne*. Tout au long de cette étude, nous en avons caractérisés quatre dont un seul qui diffère des trois autres (*rne*::Tn5 (aa 867), *rne*::Tn5 (aa 883), *rne*::Tn5 (aa 997)) par son insertion au niveau de la région catalytique (*rne*::Tn5 (aa 500)) (figure 16).

4.3 Le défaut d'assemblage du dégradosome aurait une influence sur l'activité de la RNase E en modulant l'accès à son substrat.

Le modèle de la souche ENS134 (Lopez et al., 1994) (figure 17), nous permet de déterminer dans un premier temps l'activité de la RNase E sauvage et des différents mutants de la protéine exprimés par chaque supresseur, en mesurant l'expression de la β -galactosidase. Ainsi, plus l'expression de la β -galactosidase est basse, plus l'activité de la RNase E exprimée par le gène d'intérêt est forte puisque l'ARNm T7-*lacZ* est très sensible à la ribonucléase. La protéine Rne Δ 10 qui présente l'activité ribonucléasique la plus forte, (son niveau d'expression de la β -galactosidase étant la plus basse (323,55)), est produite suite à la délétion de la partie C-terminale responsable des interactions entre la RNase E et l'énolase ainsi que la PNPase (Vanzo et al., 1998).

Des études faites *in vivo* ont démontré que chez des souches d'*E. coli* n'exprimant pas la queue C-terminale de la RNase E, il y'aurait une association directe entre la PNPase- α et l'hélicase RhlB, formant un complexe actif ribonucléolytique ayant une masse moléculaire avoisinant celle attribuée pour la PNPase soit 377-380 kDa (Lin & Lin-Chao, 2005). Les deux dimères formant l'autre sous-unité (β) seraient la RhlB, hélicase qui déroulerait des structures double-brin d'ARN, s'ensuivrait une dégradation de structures aussi bien double-brin que simple-brin par l'action d'exonucléase de la sous-unité PNPase- α . En revanche, l'association entre la PNPase et l'énolase serait indirecte et dépendante de la région C-terminale de la RNase E. Ceci dit, même si elle ne peut interagir avec la RNase E, la PNPase en formant ce complexe actif avec la RhlB peut dégrader de façon efficace les mêmes substrats que la RNase E et participer au côté de cette dernière au « turn over » d'un grand nombre de structures ARNs.

Nos quatre supprimeurs à l'étude présentent tous une expression de la β -galactosidase supérieure à celle de la souche sauvage. Il faut cependant noter qu'il existe une nette différence entre la protéine issue de l'insertion *rne::Tn5* (aa 500) dans la région catalytique amino-terminale et les trois autres protéines. En effet, l'activité de cette protéine (10550) s'apparente plus à celle de la protéine Rne Δ 14 (10723,1) produite suite à une délétion des deux régions de liaison à l'ARN (AR1 et AR2) ainsi qu'une délétion des sites de liaison à l'hélicase RhlB (HBS) et l'énolase (EBS), voir figure 11. On pourrait penser dans un premier temps que lorsque l'interaction entre la RNase E et la PNPase est interrompue, l'endoribonucléase devient davantage plus active. Ce défaut d'interaction pourrait faciliter dans un sens l'accès au substrat (l'ARN nouvellement transcrit des R-loops, les ARNms, ARNt, ARNr), puisque la polynucléotide phosphorylase est une holoenzyme d'une masse moléculaire d'environ 377-380 kDa. Par ailleurs, lorsqu'on analyse de près la structure de la RNase E (figure 11), on remarque que les domaines de liaison à l'ARN (AR1 et AR2) sont également localisés au niveau de la plate-forme servant de lieu d'interaction avec les autres protéines du dégradosome. Ainsi, la portion catalytique (amino-terminale) demeurant

intégrée et fonctionnelle avec les sites AR1 et AR2, la protéine Rne Δ 10 est plus active que la RNase E sauvage.

Si on regarde nos résultats, on remarque donc que les mutants qui présentent une baisse de l'activité de la RNase E seraient ceux où on observe une délétion de la RBD (Rne Δ 14) ou une insertion du transposon Tn5 dans la région amino-terminale (*rne*::Tn5 (aa 500)) rendant par le fait même toutes les régions adjacentes non-fonctionnelles (le domaine RBD et la plateforme où interagissent les protéines). Les trois autres mutants (*rne*::Tn5 (aa 867), *rne*::Tn5 (aa 883) et *rne*::Tn5 (aa 997)) présentent une activité plus ou moins forte de la RNase E cependant inférieure à la protéine sauvage. Si l'on s'en tient à la structure de la RNase E présentée à la figure 11, on remarque que ces insertions se localisent dans une région dont la fonction n'a pas encore été identifiée (résidus 850- 1021).

Autrement dit, ces trois différentes insertions du transposon Tn5 auraient comme seul impact majeur, le défaut d'interaction de la RNase E avec la PNPase. Il a été mentionné plus haut que la protéine Rne Δ 10 la plus active, ne présente aucune interaction ni avec l'énolase ni avec la PNPase. On pourrait suggérer que ce soit l'interaction avec l'enzyme glycolytique qui soit critique et qui fasse balancer le niveau d'activité de la RNase E. En effet, l'assemblage du dégradosome pourrait empêcher l'accès au substrat surtout quand on maintient comme seule activité enzymatique majeure le caractère d'« endonucléase ». Effectivement, depuis sa découverte en 1955 par Grunberg-Manago *et al.*, la PNPase joue un rôle majeur d'exoribonucléase (3'→5') chez *E. coli* (Portier, 1975)

Autrement dit la seule façon pour une molécule d'ARN d'être dégradée par l'endoribonucléase RNase E lorsque celle-ci n'interagit pas avec la PNPase, serait que la RNase E la reconnaisse tout d'abord par le biais des sites RBD, ensuite que le substrat soit pris en charge par la portion catalytique de l'enzyme. Ainsi donc, si la première étape ne se déroule pas avec une grande efficacité en raison d'un encombrement allostérique ceci aurait un impact majeur sur l'activité de l'enzyme. En effet, quand on observe la structure de la RNase E selon la figure 11, on remarque que le site de liaison à l'énolase est à proximité du

second site de liaison à l'ARN (AR2). Tout ceci expliquerait donc pourquoi nos trois mutants (*rne::Tn5* (aa 867), *rne::Tn5* (aa 883) et *rne::Tn5* (aa 997)) présentent une activité inférieure à la souche ENS 134-10.

Dans le même ordre d'idées, nos trois mutants présentent une activité inférieure à la souche sauvage sachant que ceux-ci possèdent uniquement une activité endonucléasique pour dégrader les ARNs. Cependant, quand l'enzyme sauvage possède toute son intégrité, l'assemblage du dégradosome ARN permet l'expression des deux fonctions, soient exonucléasique et endonucléasique.

En ce qui concerne la protéine issue de l'insertion dans la portion amino-terminale, elle possède une activité de loin inférieure à la souche sauvage et plutôt similaire à la souche ENS 134-14 puisque l'insertion du transposon se situe au niveau du « petit domaine », entraînant une suppression de toute la région non-catalytique de la RNase E et par conséquent en plus d'un défaut d'assemblage du dégradosome, l'incapacité de se lier aux molécules d'ARNs.

4.4 Il n'y a pas de corrélation entre le degré d'activité de la RNase E et sa capacité à réduire le cSDR

Suite à l'analyse de l'activité de la RNase E exprimée par nos supresseurs extragéniques, on a voulu déterminer s'il existait un lien direct avec la réduction du cSDR au sein des cellules qui portent ces différentes mutations. On a ainsi procédé tout d'abord par une expérience d'EOP sur milieu riche à température permissive (30°C) puis restrictive (42°C) en combinant les mutations *rnhA* et *dnaA*(Ts) à celles de nos supresseurs. Les résultats nous montrent qu'effectivement l'absence de la RNase HI augmente le taux de réplication qu'affiche normalement une cellule sauvage. En effet, chez la souche MD48 qui présente essentiellement la mutation thermosensible au niveau de la protéine DnaA, l'initiation de la

réplication ne peut se faire à une température équivalente ou supérieure à 42°C. De ce fait, seules 2 cellules sur 10^6 sont capables de survivre à température restrictive contrairement à 3 cellules sur 10 chez la souche JE1. En effet, compte tenu de la mutation au niveau de la RNase HI, même si l'initiation de la réplication du chromosome ne peut être effectuée par la protéine DnaA au niveau de la région *oriC* à 42°C, on observe plusieurs autres foyers alternatifs de réplication comme les sites *oriKs* constitués d'hybrides ARN-ADN (R-loops), sites d'initiation du cSDR. Les résultats montrent une diminution considérable du cSDR chez nos supresseurs puisque leur valeur d'EOP est nettement inférieure à celle de notre contrôle positif JE1. Ainsi, il s'agit des souches JE6, JE16, JE36 ayant respectivement des valeurs d'EOP équivalant à 3 sur 10^3 pour les deux premières et 4 sur 10^3 . En ce qui concerne la souche JE63, aucune croissance n'a été observée sur les géloses incubées à une température de 42°C, ainsi la valeur d'EOP est nulle. On remarque dans un premier temps que les valeurs d'EOP appartenant aux supresseurs JE6, JE16 et JE36 sont intermédiaires car comprises entre celles de MD48 et JE1. Ensuite, ces 3 supresseurs présentent une capacité plutôt similaire à réduire le cSDR, la différence entre les valeurs d'EOP étant négligeable; alors que ce n'est pas le cas concernant le niveau d'activité de leur RNase E. S'il existait une corrélation entre le degré d'activité de l'endoribonucléase et sa capacité à réduire le cSDR, on s'attendrait à attribuer la plus petite valeur d'EOP à la souche JE16 puisque celle-ci présente le plus haut niveau d'activité de la RNase E et la plus grande valeur à la souche JE63. Cependant, chez cette dernière, il se produit un tout autre scénario puisque la valeur d'EOP correspondante est nulle.

Par ailleurs, il a été question de savoir si cette réduction du cSDR n'était pas due à une incompatibilité des mutations de nos supresseurs avec la mutation thermosensible *dnaA*(Ts). On a donc également évalué les valeurs d'EOP de nos doubles mutants JE101 ($1.6/10^5$), JE107 ($1.6/10^7$), JE119 ($4/10^6$) et JE103. À l'exception de la souche JE103 qui présente une fois de plus une valeur nulle, ces valeurs sont plus petites que celles observées chez les triples mutants ce qui témoigne tout d'abord de la compatibilité des 2 mutations

prises en question et notamment de la présence de la RNase HI à l'état sauvage dans la cellule.

On a également reproduit la même expérience mais sur un milieu pauvre M9 et avec un temps d'incubation deux fois plus long. Ce milieu exempt de nutriments aura comme répercussion une baisse de toutes activités métaboliques énergivores dans la cellule. De cette façon, on pourra mieux observer le phénomène de cSDR puisqu'il y'aura moins de collision de fourches, moins de cellules anucléés. Dans ce cas précis, il a été question de comparer les différents niveaux de croissance en tenant compte de l'étendue des colonies sur les stries effectuées sur le milieu de croissance. Les résultats sont les mêmes qu'observés lors de l'EOP, en effet, les souches JE6, JE16 et JE36 affichent une croissance intermédiaire entre la souche contrôle MD48 et JE1. De ce fait, quelque soit la valeur nutritive du milieu de croissance, la RNase E est apte à dégrader les molécules d'ARNs qui s'hybrident au brin d'ADN matrice.

4.5 La diminution de la reponse SOS chez nos supresseurs est due à un effet négatif de ceux-ci sur les R-loops.

Il a été mentionné ci-dessus que les R-loops sont stables chez les mutants *rnhA*. De cette façon, ceux-ci deviennent des obstacles pour le déplacement des fourches de réplication, provoquant ainsi un arrêt prématuré du réplisome et une accumulation d'ADN simple-brin dans la cellule. Ces événements vont déclencher un signal de stress cellulaire et une modification du niveau d'expression des gènes appartenant au régulon SOS, tels que le gène *sfiA*. Les résultats issus du dosage de la beta-galactosidase lors de la fusion transcriptionnelle *sfiA::lacZ* (tableau 8, figure 24) démontrent dans un premier temps que le niveau d'expression du gène *sfiA* chez nos supresseurs est nettement inférieur à la souche où l'on a muté la RNase HI. Nos résultats suggèrent qu'au sein des cellules exprimées par nos supresseurs, moins de mécanismes de réparation de cassure double brin *recA*-

dépendant sont mis en branle. De ce fait, cette baisse dans le recrutement de la protéine RecA sera à l'origine d'une diminution de l'induction de la réponse SOS et aura donc pour conséquence une réduction du niveau d'expression du gène *lacZ* fusionné et sous le contrôle du promoteur du gène *sfiA*. En effet, des études ont démontré que chez les mutants *rnhA224* et *rnhA339::cat*, où l'activité de la RNase HI est absente, ceux-ci expriment de façon chronique la fusion transcriptionnelle *sfiA::lacZ* selon un processus RecA⁺ et LexA⁺-dépendant (Kogoma et al., 1993). Ces résultats indiquent que sachant que l'absence de la RNase HI au sein des cellules déclenche une expression constitutive de la réponse SOS, la réduction du cSDR par nos supresseurs géniques *rne* est dû à un effet négatif sur les R-loops.

4.6 La réduction du cSDR est étroitement liée à une suppression des sites *oriKs* localisés dans la région *Ter*, ceci ayant une incidence directe sur le ratio *oriC/Ter* dans les cellules.

Nous savons que la réplication peut survenir dans des sites autres que la région *oriC*, ces sites sont entre autres les sites *oriKs* formés suite à l'hybridation d'un transcrit ARN sur un brin d'ADN matrice (R-loop) chez des mutants *rnhA*; tout ceci se produisant selon le mode de réplication cSDR. Ainsi, il n'est donc pas surprenant d'observer dans nos résultats que la valeur du ratio *oriC/Ter* de la souche sauvage soit supérieure à celle de la souche *rnhA*. En effet, chez la souche sauvage, cette valeur du ratio est due à une initiation très fréquente de nouvelles rondes de réplication et ce même avant que les précédentes ne soient complétées. En ce qui concerne le mutant *rnhA*, la naissance de nouvelles fourches de réplication au sein des sites *oriKs* localisés dans la région *Ter*, vont faire de cette région la séquence d'ADN la plus répliquée au sein du chromosome. Après analyse des valeurs ratio *oriC/Ter* des supresseurs géniques à l'étude, on constate qu'elles sont comprises entre celles de la souche sauvage et du mutant *rnhA*. En effet, elles sont inférieures à la souche sauvage et

supérieures à celle du mutant *rnhA*. Ceci témoigne une fois de plus de leur efficacité à réduire le cSDR tel que démontré dans les expériences précédentes. En revanche, la valeur de leur ratio *oriC/Ter* n'est une fois de plus pas proportionnelle à l'activité de leur RNase E. Si on se fie une fois de plus au niveau d'activité de leur endoribonucléase, on s'attendrait à ce que le suppresseur correspondant à l'activité de la RNase E la plus forte (JE131- 1893) soit celui qui affiche le ratio le plus élevé parmi ceux des suppresseurs à l'étude (4,6) pourtant celui affiche un ratio équivalent à 4,1. De la même façon, le suppresseur correspondant à l'activité de la RNase E la plus basse (JE 58- 10 550) affiche une valeur de ratio *oriC/Ter* de 4,4.

La région *ter* du chromosome étant hyper-recombinogénique en raison de la collision des fourches de réplication initiée soit au site *oriC* ou au site *oriKs*, si la cellule est privée de la protéine RecA, ceci va empêcher l'initiation des processus de réparation des cassures simple brins ou double-brins. Autrement dit, l'absence de la protéine RecA va favoriser la dégradation de la région *ter* par les nucléases. En effet, la plus haute valeur du ratio *oriC/Ter* en milieu LB n'est pas attribuée à la souche *recA* mais plutôt au double mutant *recA rnhA* (JE133). Ce résultat supporte notre interprétation que le ratio *oriC/ter* plus bas dans les mutants *rnhA* reflète la présence de cSDR. Par ailleurs, les valeurs qui correspondent au milieu LB sont nettement supérieures à celles du milieu M9 sachant que le contenu du milieu de croissance en éléments nutritifs a une incidence directe sur les différentes réactions métaboliques telles que la réplication.

4.7 La voie de dégradation des ARNms empruntée par les suppresseurs extragéniques dépend de la structure de leur RNase E.

Les résultats ci-dessus confirment sans aucun doute que nos suppresseurs géniques réduisent considérablement le cSDR. A travers ceux-ci, on peut distinguer probablement

deux profils différents au niveau de l'activité enzymatique selon le lieu d'insertion du transposon Tn5 au sein de l'endoribonucléase. En effet, la RNase E agit avec une plus grande affinité pour les substrats ARN 5' monophosphorylé générés par l'enzyme ARN pyrophosphohydrolase (RppH), on dira qu'elle emprunte la voie de clivage 5'-dépendante. Deux facteurs sont cruciaux dans cette voie métabolique, il s'agit tout d'abord de l'enzyme RppH, ensuite, des éléments de la portion catalytique compris entre les résidus 35 et 279 (figure 11) qui constitueront une poche où il y'aura interaction avec le substrat. D'autre part, il existe aussi la voie directe ou direct entry qui implique certains éléments non-identifiés de la portion carboxy-terminale. Ainsi donc, nos supprimeurs ont le choix d'emprunter l'une ou l'autre voie de dégradation afin de réduire le cSDR. Il est important de se rappeler qu'au sein de la souche où ont été isolés ces différents supprimeurs, l'ARN nouvellement transcrit a tendance à s'hybrider avec le brin matrice d'ADN pour former des R-loops. De ce fait, l'extrémité 5' de la molécule ARN pourrait être moins disponible comme substrat pour la dégradation, ce qui va plutôt favoriser l'usage de la voie directe par nos supprimeurs.

Des études démontrent que la queue CTH est indispensable pour le processus de dégradation par la voie directe. Toutefois, l'assemblage du dégradosome ARN ne serait pas essentiel. En effet, la délétion individuelle ou simultanée de la PNPase et l'hélicase RhlB n'a aucun impact sur l'activité de la RNase E (K. Anupama et al., 2011). Ceci reflète parfaitement la structure de trois de nos supprimeurs qui appartiennent au même profil de dégradation. Effectivement, les insertions du transposon Tn5 étant au niveau des résidus 867, 883 et 997 de la portion carboxy-terminale, toutes les régions en aval de chaque insertion sont supprimées. Lorsqu'on se réfère à la structure de la RNase E (figure 11), on constate que les éléments supprimés chez nos trois supprimeurs sont en aval du second site de liaison à l'ARN (AR2) et comprennent le site de liaison à l'énolase, une longue séquence dont la fonction n'a pas encore été identifiée et le site de liaison à la PNPase. Donc, si effectivement l'extrémité 5' de l'ARN est indisponible, la RNase E ne peut dégrader l'ARN qu'en empruntant la voie directe, c'est-à-dire que le clivage se fera à

l'intérieur de la molécule. Afin d'éviter tout encombrement allostérique et maximiser l'efficacité de la protéine, celle-ci va se débarrasser de l'exonucléase PNPase dont l'activité n'est pas requise ainsi que les fonctions non-essentiels (probablement la séquence non-identifiée comprise entre le site de liaison à l'énolase et à la PNPase).

Par ailleurs, on remarque que le suppresseur ayant une insertion au niveau du résidu 500 de la région catalytique présente un profil tout à fait différent des trois autres cités ci-dessus. En effet, ce dernier pourrait probablement compléter le double mutant *topA rnhA* en diminuant la réplication à partir d'origines de réplication potentielles telles que les sites *oriKs* ainsi que de la région *oriC*. Tandis que, chez les autres suppresseurs dont les insertions se localisent au niveau de la portion amino-terminale de la RNase E la complémentation se ferait via une diminution de la réplication uniquement à partir de l'origine *oriC*.

4.8 La diminution du cSDR par nos suppresseurs n'a aucune influence sur le degré de synchronisation du cycle cellulaire.

Les résultats de cytométrie en flux révèlent une fois de plus que nos suppresseurs à l'étude diminuent considérablement le cSDR et ce, en abaissant la quantité d'ADN présente dans ces cellules. En effet, les courbes de nos trois suppresseurs qui ont été traités avec de la rifampicine (figure 26) présentent une distribution de masse d'ADN plus petite (différence plus prononcée à partir du second pic) que notre contrôle positif (présence de cSDR). Malgré cette baisse de la masse d'ADN, on n'observe guère une synchronisation du cycle cellulaire tel qu'affiche la souche sauvage (figure 25). Ensuite, à travers ces résultats (figure 27), on remarque une fois de plus que le suppresseur provenant de l'insertion du transposon Tn5 dans la région amino-terminale possède un profil différent des trois autres. En réalité, on distingue la difficulté pour cette souche à former deux pics distincts et ce même si il y'a une diminution très marquée de la quantité d'ADN dans les cellules

comparativement à notre contrôle positif (présence de cSDR). Cette difficulté à former deux pics distincts pourrait s'expliquer par une activité de cette RNase E non pas seulement au niveau de l'ARN des R-loops mais aussi de l'amorce d'ARN au niveau de la séquence d'origine *oriC*. Autrement dit, la RNase E ne serait pas seulement en compétition avec le complexe de redémarrage des fourches au niveau des sites *oriKs*, mais aussi avec la protéine d'initiation de la réplication DnaA au niveau du site *oriC*. En dépit du fait que les suppresseurs extragéniques dégradent l'ARN des R-loops qui génère de potentielles origines de réplication, cette baisse considérable du cSDR n'est pas synonyme d'un quelconque rétablissement de la synchronisation du cycle cellulaire, caractéristique de la souche sauvage ayant comme unique origine de réplication la région *oriC*. Donc, l'absence de synchronisation de la réplication dans les mutants *rnhA* n'est peut-être pas due principalement à la présence de cSDR.

5. Conclusion

À partir des résultats de cette étude, il convient de dire que les supresseurs extragéniques isolés suite à l'insertion du transposon Tn5 au sein de l'endoribonucléase RNase E ont corrigé le défaut de croissance de la souche VU22 et ce en réduisant le taux de sur-réplication présent dans la cellule. En effet, c'est en diminuant considérablement le cSDR présent dans les cellules à l'étude qu'ils ont été capables de rétablir la viabilité de cette souche. La caractérisation de nos supresseurs extragéniques à travers cers diverses expérimentations a permis de conclure que la RNase E représentait une véritable alternative à l'absence de la RNase HI et que son rôle ne se limitait plus seulement à celle d'une enzyme majeure ayant un rôle global dans le métabolisme des ARNs incluant la maturation des ARNs non-codants et la dégradation des ARNms (Carpousis et al., 2009). Bien plus encore, en substituant la RNase HI, elle exerce un rôle non seulement au niveau du métabolisme des ARNs mais aussi un impact majeur au sein de la régulation des R-loops et par le fait même de la topologie de l'ADN. Il a été démontré dans des études antérieures que les supresseurs géniques rho ou nusG sont des mutants qui empêchent le processus de terminaison Rho-dépendante de la transcription et qu'en présence de la RNase HI ou de l'hélicase UvsW du phage T4, ils représentent une voie alternative de dégradation pour la dégradation des ARNs dans des cellules n'ayant pas la RNase E (Gowrishankar & Harinarayanan, 2004; Harinarayanan & Gowrishankar, 2003). En effet, certaines études ont proposé que ce seraient l'abondance des R-loops qui, considérablement à la hausse dans ces mutants défectueux dans la terminaison rho-dépendante, contribueraient à échapper à la létalité associée avec la perte des 2 voies de dégradations de la RNase E, en procurant une voie alternative pour la dégradation des molécules ARNs. Dans notre contexte, la cellule va plutôt trouver une façon de rétablir la viabilité en opérant des mutations au sein de la ribonucléase RNase E après une perte de fonctions de la RNase HI. En réalité, les bactéries sont sujettes à des modifications de leur génome en fonction des nouveaux besoins en facteur de croissance ou d'une adaptation à un nouvel environnement. Dans ce cas précis, il fallait trouver une nouvelle voie de dégradation permettant à la RNase E de dégrader l'ARN présent dans les hybrides ARN-ADN, activité essentiellement effectuée par la

RNase HI. Par ailleurs, suite à la caractérisation des quatre supprimeurs extragéniques à l'étude, on a conclu que ceux-ci pouvaient correspondre à 2 profils différents dépendamment de la voie de dégradation empruntée et du lieu d'insertion du transposon Tn5 au sein de l'endoribonucléase. En somme, les R-loops bien qu'étant un aspect négatif pour la croissance des cellules semblent fournir une alternative dans les voies de dégradation des ARNs lorsqu'une des deux ribonucléases majeures n'est pas disponible au sein de la cellule.

6. Perspectives

Suite à l'analyse de nos supresseurs extragéniques, on a prétendu que le lieu d'insertion du transposon Tn5 dictait la voie de clivage à emprunter. En effet, un seul des quatre supresseurs qui a le transposon inséré dans la région catalytique affiche un profil de dégradation de l'ARN tout à fait différent des autres, celui-ci utiliserait selon nous uniquement la voie de clivage 5'-dépendante. Sachant que cette voie nécessite des protéines telles que l'ARN pyrophosphorylase (RppH) qui convertit l'ARN 5'triphosphate en 5'monophosphates (Celesnik et al., 2007) et que des études antérieures ont démontré que la mutation (substitution) de la RNase E (R169Q) abolissait la stimulation par les substrats 5'monophosphatés (Garrey et al., 2009), on pourrait combiner les mutations $\Delta rppH/ rne::Tn5$ (aa 500) ou $rneR169Q/ rne::Tn5$ (aa 500) afin de tester leur létalité sachant que l'endoribonucléase RNase E est une enzyme essentielle et qu'en combinant ces mutations aucune activité de cette dernière ne sera possible.

De surcroît, on ignore encore quels sont les éléments de la région carboxy-terminale qui jouent un rôle important dans la voie de clivage 5'-indépendante. Étant donné que chez les trois autres supresseurs extragéniques les insertions du transposon Tn5 se localisent dans une région encore non identifiée de la portion non catalytique (entre le site de liaison à l'énolase et le site de liaison à la PNPase), on pourrait diriger les insertions vers des régions déjà identifiées telles que les deux régions riches en arginine (AR1 et AR2, figure 11) servant de sites de liaison à l'ARN ainsi que le site de liaison à l'hélicase RhlB (HBS) afin de déterminer si l'endoribonucléase RNase E en dépit de ces fonctions, peut dégrader efficacement les substrats ARN selon le mode « direct entry ». Ceci nous permettra de procéder par élimination et d'identifier par le fait même les éléments indispensables de cette voie de dégradation 5'-indépendante.

7. Bibliographie

- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., & Cozzarelli, N. R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, 71(2), 277-288
- Apirion, D., & Lassar, A. B. (1978). A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J Biol Chem*, 253(5), 1738-1742
- Arenson, T. A., Tsodikov, O. V., & Cox, M. M. (1999). Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *J Mol Biol*, 288(3), 391-401.doi:10.1006/jmbi.1999.2705
- Arraiano, C. M., Andrade, J. M., Domingues, S., Guinote, I. B., Malecki, M., Matos, R. G., Moreira, R. N., Pobre, V., Reis, F. P., Saramago, M., Silva, I. J., & Viegas, S. C. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev*, 34(5), 883-923.doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00242.x
- Ausubel, F. M. (1994). *Current protocols in molecular biology*. New York ; Toronto: J. Wiley.
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y. C., & Drolet, M. (2004). RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 54(1), 198-211.doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04258.x
- Baker, K. E., & Mackie, G. A. (2003). Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 47(1), 75-88
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S., (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2), 95-113

- Bermudez-Cruz, R. M., Fernandez-Ramirez, F., Kameyama-Kawabe, L., & Montanez, C. (2005). Conserved domains in polynucleotide phosphorylase among eubacteria. *Biochimie*, 87(8), 737-745.doi:10.1016/j.biochi.2005.03.005
- Bouvier, M., & Carpousis, A. J. (2011). A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol Microbiol*, 82(6), 1305-1310.doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07894.x
- Broccoli, S., Phoenix, P., & Drolet, M. (2000). Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 35(1), 58-68
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J., & Drolet, M. (2004). Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol*, 52(6), 1769-1779.doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04092.x
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, & Emili, A. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*, 433(7025), 531-537.doi:10.1038/nature03239
- Callaghan, A. J., Aurikko, J. P., Ilag, L. L., Gunter Grossmann, J., Chandran, V., Kühnel, K., Poljak, L., Carpousis, A. J., Robinson, C. V., Symmons, M. F., & Luisi, B. F. (2004). Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *J Mol Biol*, 340(5), 965-979.doi:10.1016/j.jmb.2004.05.046
- Callaghan, A. J., Marcaida, M. J., Stead, J. A., McDowall, K. J., Scott, W. G., & Luisi, B. F. (2005a). Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*, 437(7062), 1187-1191.doi:10.1038/nature04084

- Carpousis, A. J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol*, 61, 71-87.doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093440
- Carpousis, A. J., Luisi, B. F., & McDowall, K. J. (2009). Endonucleolytic initiation of mRNA decay in *Escherichia coli*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 85, 91-135.doi:10.1016/s0079-6603(08)00803-9
- Carpousis, A. J., Vanzo, N. F., & Raynal, L. C. (1999). mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet*, 15(1), 24-28
- Causton, H., Py, B., McLaren, R. S., & Higgins, C. F. (1994). mRNA degradation in *Escherichia coli*: a novel factor which impedes the exoribonucleolytic activity of PNPase at stem-loop structures. *Mol Microbiol*, 14(4), 731-741
- Celesnik, H., Deana, A., & Belasco, J. G. (2007). Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5'pyrophosphate removal. *Mol Cell*, 27, 79-90
- Deutscher, M. P. (2009). Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 85, 369-391.doi:10.1016/s0079-6603(08)00809-x
- Deutscher, M. P., & Li, Z. (2001). Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66, 67-105
- DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., & Wright, A. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, 31(1), 43-51
- Diwa, A., Bricker, A. L., Jain, C., & Belasco, J. G. (2000). An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev*, 14(10), 1249-1260
- Drlica, K. (1992). Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol*, 6(4), 425-433
- Drolet, M. (2006). Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop

- formation and DNA topology. *Mol Microbiol*, 59(3), 723-730.doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05006.x
- Drolet, M., Baaklini, I., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., C, F., & Massé, E. (2003). The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci.* 8, 210-221
- Drolet, M., Bi, X., & Liu, L. F. (1994). Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *J Biol Chem*, 269(3), 2068-2074
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L. F., & Crouch, R. J. (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3526-3530
- Fossum, S., Crooke, E., & Skarstad, K. (2007). Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 26(21), 4514-4522.doi:10.1038/sj.emboj.7601871
- Fukushima, S., Itaya, M., Kato, H., Ogasawara, N., & Yoshikawa, H. (2007). Reassessment of the in vivo functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *J Bacteriol*, 189(23), 8575-8583.doi:10.1128/jb.00653-07
- Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., Moore, C. J., Cohen, S. N., & Georgiou, G. (2006). Differential modulation of *Escherichia coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol*, 61(2), 394-406.doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05246.x
- Garrey, S. M., Blech, M., Riffel, J. L., Hankins, J. S., L.M, S., & Diver, M. (2009). Substrate binding and active residues in RNases E and G: role of the 5'-sensor. *J Biol Chem*, 284, 31843-31850
- Gasol, J. M., Zweifel, U. L., Peters, F., Fuhrman, J. A., & Hagstrom, A. (1999). Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as

- measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 65(10), 4475-4483
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(11), 3872-3876
- Ghora, B. K., & Apirion, D. (1978). Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *Escherichia coli*. *Cell*, 15(3), 1055-1066
- Gowrishankar, J., & Harinarayanan, R. (2004). Why is transcription coupled to translation in bacteria? *Mol Microbiol*, 54, 598-603
- Grunberg-Manago, M., Oritz, P. J., & Ochoa, S. (1955). Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science*, 122(3176), 907-910
- Hankins, J. S., Zappavigna, C., Prud'homme-Genereux, A., & Mackie, G. A. (2007). Role of RNA structure and susceptibility to RNase E in regulation of a cold shock mRNA, *cspA* mRNA. *J Bacteriol*, 189(12), 4353-4358.doi:10.1128/jb.00193-07
- Harinarayanan, R., & Gowrishankar, J. (2003). Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 332, 31-46
- Harmon, F. G., DiGate, R. J., & Kowalczykowski, S. C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell*, 3(5), 611-620
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P., & Grissem, W. (1996). Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J*, 15(5), 1132-1141

- Hong, X., Cadwell, G. W., & Kogoma, T. (1995). *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation. *EMBO J*, 14(10), 2385-2392
- Hraiky, C., Raymond, M. A., & Drolet, M. (2000). RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275(15), 11257-11263
- Itaya, M., & Crouch, R. J. (1991). A combination of RNase H (rnh) and recBCD or sbcB mutations in *Escherichia coli* K12 adversely affects growth. *Mol Gen Genet*, 227(3), 424-432
- Jain, C., & Belasco, J. G. (1995). Autoregulation of RNase E synthesis in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Symp Ser*(33), 85-88
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci*, 4(6), 338-344
- Jiang, X., & Belasco, J. G. (2004). Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25), 9211-9216.doi:10.1073/pnas.0401382101
- K. Anupama, Leela, J. K., & Gowrishankar, J. (2011). Two pathways for RNase E action in *Escherichia coli* in vivo and bypass of its essentiality in mutants defective for Rho-dependent transcription termination. *Mol Microbiology*, 82(6), 1330-1348
- Kalman, M., Murphy, H., & Cashel, M. (1991). *rhlB*, a new *Escherichia coli* K-12 gene with an RNA helicase-like protein sequence motif, one of at least five such possible genes in a prokaryote. *New Biol*, 3(9), 886-895
- Khemici, V., Poljak, L., Luisi, B. F., & Carpousis, A. J. (2008). The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*, 70(4), 799-813.doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06454.x
- Kogoma, T. (1978). A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol*, 121(1), 55-69

- Kogoma, T. (1994). *Escherichia coli* RNA polymerase mutants that enhance or diminish the SOS response constitutively expressed in the absence of RNase HI activity. *J Bacteriol*, 176(5), 1521-1523
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(2), 212-238
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G. W., Barnard, K. G., & Asai, T. (1993). Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie*, 75(1-2), 89-99
- Kogoma, T., & Lark, K. G. (1970). DNA replication in *Escherichia coli*: replication in absence of protein synthesis after replication inhibition. *J Mol Biol*, 52(2), 143-164
- Kogoma, T., & Lark, K. G. (1975). Characterization of the replication of *Escherichia coli* DNA in the absence of protein synthesis: stable DNA replication. *J Mol Biol*, 94(2), 243-256
- Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., & Elela, S. A. (2001). The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol*, 3(4), 71-78
- Larsen, R. A., Wilson, M.M., Guss, A.M., & Metcalf, W.W. (2002). Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch Microbiology*, 178, 193-201
- Lee, K., & Cohen, S. N. (2003). A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol Microbiol*, 48(2), 349-360
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., Cohen, S. N., & Georgiou, G. (2003). RraA. a protein inhibitor of RNase E activity that

- globally modulates RNA abundance in *Escherichia coli*. *Cell*, 114(5), 623-634
- Leroy, A., Vanzo, N. F., Sousa, S., Dreyfus, M., & Carpousis, A. J. (2002). Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol*, 45(5), 1231-1243
- Levine, C., Hiasa, H., & Marians, K. J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta*, 1400(1-3), 29-43
- Lin, P. H., & Lin-Chao, S. (2005). RhlB helicase rather than enolase is the β -subunit of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase (PNPase)–exoribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(46), 16590-16595
- Liu, L. F., & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20), 7024-7027
- Lloyd, R. G., & Sharples, G. J. (1993). Dissociation of synthetic Holliday junctions by *Escherichia coli* RecG protein. *EMBO J*, 12(1), 17-22
- Lockshon, D., & Morris, D. R. (1983). Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA gyrase inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 11(10), 2999-3017
- Lohman, T. M., & Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem*, 65, 169-214.doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.001125
- Lopez, P. J., Iost, I., & Dreyfus, M. (1994). The use of a tRNA as a transcriptional reporter: the T7 late promoter is extremely efficient in *Escherichia coli* but its transcripts are poorly expressed. *Nucleic Acids Res*, 22(12), 2434

- Lusetti, S. L., & Cox, M. M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem*, 71,71-100.doi:10.1146/annurev.biochem.71.083101.133940
- Mackie, G. A. (1992). Secondary structure of the mRNA for ribosomal protein S20. Implications for cleavage by ribonuclease E. *J Biol Chem*, 267(2), 1054-1061
- Mackie, G. A. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature*, 395(6703), 720-723.doi:10.1038/27246
- Marcaida, M. J., DePristo, M. A., Chandran, V., Carpousis, A. J., & Luisi, B. F. (2006). The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem Sci*, 31(7), 359-365.doi:10.1016/j.tibs.2006.05.005
- Margossian, S. P., Li, H., Zassenhaus, H. P., & Butow, R. A. (1996). The DEXH box protein Suv3p is a component of a yeast mitochondrial 3'-to-5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. *Cell*, 84(2), 199-209
- Massé E., & Drolet, M. (1999a). Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 274(23), 16654-16658
- Massé E., & Drolet, M. (1999b). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, 274(23), 16659-16664
- Massé E., & Drolet, M. (1999c). R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, 294(2), 321-332.doi:10.1006/jmbi.1999.3264
- McCool, J. D., Long, E., Petrosino, J. F., Sandler, H. A., Rosenberg, S. M., & Sandler, S. J. (2004). Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol*, 53(5), 1343-1357.doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04225.x

- McDowall, K. J., Kaberdin, V. R., Wu, S. W., Cohen, S. N., & Lin-Chao, S. (1995). Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature*, 374(6519), 287-290.doi:10.1038/374287a0
- Michel, B., Ehrlich, S. D., & Uzest, M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J*, 16(2), 430-438
- Miczak, A., Kaberdin, V. R., Wei, C. L., & Lin-Chao, S. (1996). Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 3865-3869
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., & Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell*, 91(4), 457-466
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2002). Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Mol Microbiol*, 45(5), 1315-1324
- Morita, T., Maki, K., & Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev*, 19(18), 2176-2186.doi:10.1101/gad.1330405
- Mudd, E. A., & Higgins, C. F. (1993). *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol Microbiol*, 9(3), 557-568
- Nurmohamed, S., McKay, A. R., Robinson, C. V., & Luisi, B. F. (2010). Molecular recognition between *Escherichia coli* enolase and ribonuclease E. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 9), 1036-1040.doi:10.1107/s0907444910030015

- Ogawa, T., & Okazaki, T. (1984). Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 193(2), 231-237
- Phoenix, P., Raymond, M. A., Massé E., & Drolet, M. (1997). Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem*, 272(3), 1473-1479
- Portier, C. (1975). Structure quaternaire de la polynucléotide phosphorylase d'*Escherichia coli*: caractérisation chimique de la forme A. *Biochimie*, 57(5), 545-550
- Portier, C., & Regnier, P. (1984). Expression of the *rpsO* and *pnp* genes: structural analysis of a DNA fragment carrying their control regions. *Nucleic Acids Res*, 12(15), 6091-6102
- Pruss, G. J., & Drlica, K. (1986). Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(23), 8952-8956
- Py, B., Causton, H., Mudd, E. A., & Higgins, C. F. (1994). A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 14(4), 717-729
- Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M., & Carpousis, A. J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, 381(6578), 169-172.doi:10.1038/381169a0
- Regonesi, M. E., Del Favero, M., Basilico, F., Briani, F., Benazzi, L., Tortora, P., Mauri, P., & Dehò, G. (2006). Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie*, 88(2), 151-161.doi:10.1016/j.biochi.2005.07.012
- Robert-Le Meur, M., & Portier, C. (1992). *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase expression is autoregulated through an RNase III-dependent mechanism. *EMBO J*, 11(7), 2633-2641

- Robert-Le Meur, M., & Portier, C. (1994). Polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli* induces the degradation of its RNase III processed messenger by preventing its translation. *Nucleic Acids Res*, 22(3), 397-403
- Sandler, S. J. (2000). Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 155(2), 487-497
- Sandler, S. J. (2005). Requirements for replication restart proteins during constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 169(4), 1799-1806.doi:10.1534/genetics.104.036962
- Schlacher, K., Pham, P., Cox, M. M., & Goodman, M. F. (2006). Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chem Rev*, 106(2), 406-419.doi:10.1021/cr0404951
- Schmid, S. R., & Linder, P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol*, 6(3), 283-291
- Skarstad, K., Boye, E., & Steen, H. B. (1986). Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J*, 5(7), 1711-1717
- Snyder, L., & Champness, W. (2003). *Molecular genetics of bacteria*. (2^e édition). Washington, D.C.: ASM Press.
- Sousa, S., Marchand, I., & Dreyfus, M. (2001). Autoregulation allows *Escherichia coli* RNase E to adjust continuously its synthesis to that of its substrates. *Mol Microbiol*, 42(3), 867-878
- Spring, T. G., & Wold, F. (1971). The purification and characterization of *Escherichia coli* enolase. *J Biol Chem*, 246(22), 6797-6802
- Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., Sasaki, M. (1995). Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry*, 34(35), 11211-11216

- Symmons, M. F., Williams, M. G., Luisi, B. F., Jones, G. H., & Carpousis, A. J. (2002). Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem Sci*, 27(1), 11-18
- Taghbalout, A., & Rothfield, L. (2008). RNase E and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *J Biol Chem*, 283(20), 13850-13855.doi:10.1074/jbc.M709118200
- Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Tanguay, C., Broccoli, S., Baaklini, I., Drlica, K., & Drolet, M. (2008). Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol*, 69(4), 968-981.doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06334.x
- van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Bacterial SOS response: a food safety perspective. *Curr Opin Biotechnol*, 22(2), 136-142.doi:10.1016/j.copbio.2010.11.012
- Vanzo, N. F., Li, Y. S., Py, B., Blum, E., Higgins, C. F., Raynal, L. C., Krisch, H. M., & Carpousis, A. J. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev*, 12(17), 2770-2781
- Vologodskii, A. V., & Cozzarelli, N. R. (1994). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23, 609-643.doi:10.1146/annurev.bb.23.060194.003141
- von Meyenburg, K., Boye, E., Skarstad, K., Koppes, L., & Kogoma, T. (1987). Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 169(6), 2650-2658
- von Meyenburg, K., Hansen, F. G., Riise, E., Bergmans, H. E., Meijer, M., & Messer, W. (1979). Origin of replication, oriC, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: genetic mapping and minichromosome replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 43 Pt 1, 121-128

- Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H., & Berger, J. M. (2011). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(12), 827-841.doi:10.1038/nrm3228
- Wagner, E. G., Altuvia, S., & Romby, P. (2002). Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, 46, 361-398
- Wang, J. C. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol*, 55(3), 523-533
- Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65, 635-692.doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.003223
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1974). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 248(5451), 765
- Whitby, M. C., Ryder, L., & Lloyd, R. G. (1993). Reverse branch migration of Holliday junctions by RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. *Cell*, 75(2), 341-350
- Whitby, M. C., Vincent, S. D., & Lloyd, R. G. (1994). Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J*, 13(21), 5220-5228
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., & Cozzarelli, N. R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275(11), 8103-8113
- Zuo, Y., & Deutscher, M. P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res*, 29(5), 1017-1026

8. Annexe

Tableau 5 : Valeurs d'activité de dosage de la β -galactosidase pour les souches à l'étude

Souches	Activité β -galactosidase (Unités
	Miller, Moyenne \pm valeurs écart type)
ENS 134	565,35 \pm 119,55
ENS 134-10	323,55 \pm 108,65
JE 80	10550 \pm 1439,2
JE 82	1893,7 \pm 230,8
JE 84	3748,85 \pm 610,95
JE 86	3021,3 \pm 331,2
ENS 134-14	10723,1 \pm 933,6

Toutes les souches utilisées sont dérivées de la souche ENS 134 (BL21 (DE3), P_{lac} -T7 RNA polymérase, $P_{T7-lacZ}$)

Tableau 6 : Valeurs d'activité de dosage de la β -galactosidase pour les souches à l'étude

Souches	Activité β -galactosidase (Unités
	Miller, Moyenne \pm valeurs écart type)
MD 49	73,75 \pm 1,05
JE 29	231,94 \pm 1,39
JE 40	112,96 \pm 2,65
JE 44	104,5 \pm 3,02
JE 64	93,88 \pm 9,04
JE 66	84,84 \pm 2,81

Toutes les souches utilisées sont dérivées de la souche MD49 (AQ8107:*sfiA::lacZ*)